

靶向蛋白质组学技术在食品安全检测的应用

陈梦琪^{1,2}, 彭淼曦², 刘婧文², 黄成栋², 吴祖庆², 凌莉², 袁慕云², 陈文锐², 胡松青^{1,*}
(1.华南理工大学食品科学与工程学院, 广东 广州 510641; 2.广州海关技术中心, 广东 广州 510623)

摘要: 食品安全是关乎国民健康的重大公共卫生问题。基于质谱的靶向蛋白质组学凭借其灵敏度高、特异性强和定量准确性好等优势, 在评估食品安全方面发挥着越来越重要的作用。本文首先介绍多反应监测和平行反应监测两种常见的靶向蛋白质组学技术; 重点综述近5年靶向蛋白质组学技术在食品安全检测领域的最新研究进展, 主要涉及动物源性食品掺假鉴别、食物过敏原检测和食源性致病菌及其毒素检测; 最后对该领域未来发展进行展望。

关键词: 靶向蛋白质组学; 食品安全; 多反应监测; 平行反应监测

Application of Targeted Proteomics in Food Safety Detection

CHEN Mengqi^{1,2}, PENG Miaoxi², LIU Jingwen², HUANG Chengdong², WU Zuqing², LING Li², YUAN Muyun², CHEN Wenrui², HU Songqing^{1,*}
(1. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China;
2. Guangzhou Customs Technology Center, Guangzhou 510623, China)

Abstract: Food safety is a major global public health concern. Targeted proteomics based on mass spectrometry (MS) plays an increasingly important role in addressing this issue due to its high sensitivity, specificity, and quantitative accuracy. In this article, two common targeted proteomics approaches including multiple reaction monitoring (MRM) and parallel reaction monitoring (PRM) are briefly introduced. The progress that has been made in the application of targeted proteomics in food safety detection in the last five years is summarized including authentication of animal-derived foods, analysis of food allergens, and detection of foodborne pathogens and their toxins. Meanwhile, an outlook on the future development of this field is given.

Keywords: targeted proteomics; food safety; multiple reaction monitoring; parallel reaction monitoring

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240529-249

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 23-0297-14

引文格式:

陈梦琪, 彭淼曦, 刘婧文, 等. 靶向蛋白质组学技术在食品安全检测的应用[J]. 食品科学, 2024, 45(23): 297-310.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240529-249. <http://www.spkx.net.cn>

CHEN Mengqi, PENG Miaoxi, LIU Jingwen, et al. Application of targeted proteomics in food safety detection[J].

Food Science, 2024, 45(23): 297-310. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240529-249.

<http://www.spkx.net.cn>

食品质量与安全及其相关风险是全世界关注的重大问题, 不仅严重危害消费者健康, 还对经济和社会发展造成巨大的负面影响^[1]。为了在食品生产、加工、贮存、运输、销售到食用前的各个环节中做好食品安全控制, 必须建立快速、可靠的分析检测方法。蛋白质是生命活动的主要承担者, 也是食品的主要组成成分之一。通过蛋白质组学技术, 可以快速、准确地检测食品中蛋白质

含量、组成和结构变化, 这为评估食品真实性、质量和安全提供了有力的工具^[1]。

基于质谱的蛋白质组学主要分为两类: 发现蛋白质组学和靶向蛋白质组学^[2]。发现蛋白质组学旨在全面鉴定样品中的蛋白质。与发现蛋白质组学相反, 靶向蛋白质组学是针对性地分析样品中的特定蛋白质或多肽标志物。得益于此, 靶向蛋白质组学具有灵敏度高、特异性

收稿日期: 2024-05-29

基金项目: “十四五”国家重点研发计划重点专项 (2022YFF1100805)

第一作者简介: 陈梦琪 (1996—) (ORCID: 0009-0007-3491-7297), 女, 博士, 研究方向为分析化学。

E-mail: Mengqi_Chen_@hotmail.com

*通信作者简介: 胡松青 (1972—) (ORCID: 0000-0003-3262-8911), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品生物技术与生物加工。

E-mail: fesqhu@scut.edu.cn

强、重现性好等优点，特别适合从复杂样本（如食品）中获取蛋白质的定性和定量信息。利用靶向蛋白质组学技术开展的动物源性食品掺假鉴别、食物过敏原定量检测均凸显了该方法的优越性^[2-4]。近5年，靶向蛋白质组学技术在食品安全检测领域取得了许多新的进展^[5]，例如通过分析特征肽准确检测食源性致病菌，对食品微生物安全控制具有重要意义。本文主要系统介绍靶向蛋白质组学技术，综述其在食品安全检测领域的最新研究进展，并展望未来的发展方向。

1 靶向蛋白质组学技术概述

靶向蛋白质组学从其概念的提出，发展至今已逐渐成为食品科学研究的重要工具^[1]。图1为靶向蛋白质组学研究策略的工作流程示意图。食品样品首先通过蛋白提取（如超声处理）和胰蛋白酶解转化为多肽混合物。然后，通过高效液相色谱-串联质谱（high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS）仪采集特定多肽的母离子及其子离子的质谱数据，从而实现目标蛋白质的定性和定量分析（图1a）。

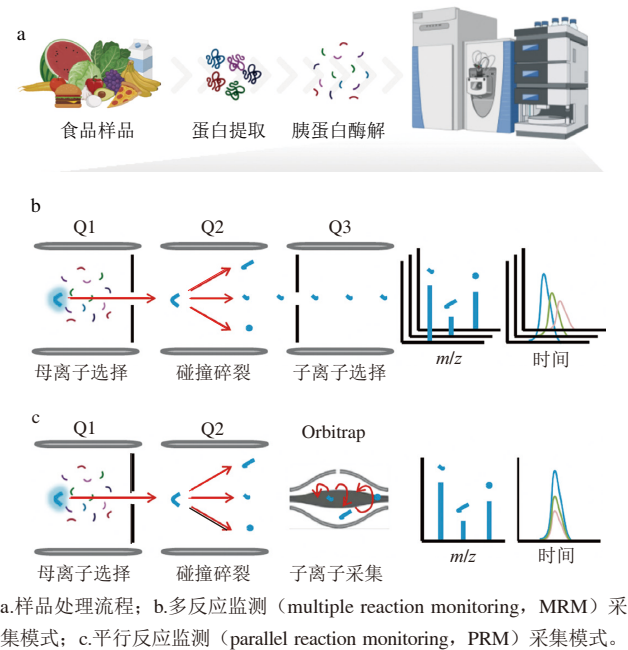


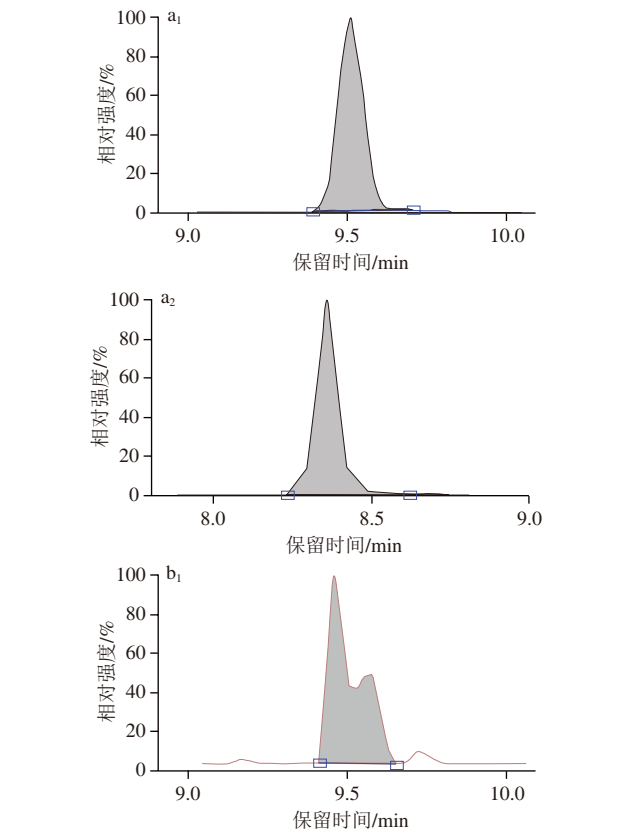
图1 靶向蛋白质组学的工作流程示意图
Fig. 1 Schematic workflow of targeted proteomics

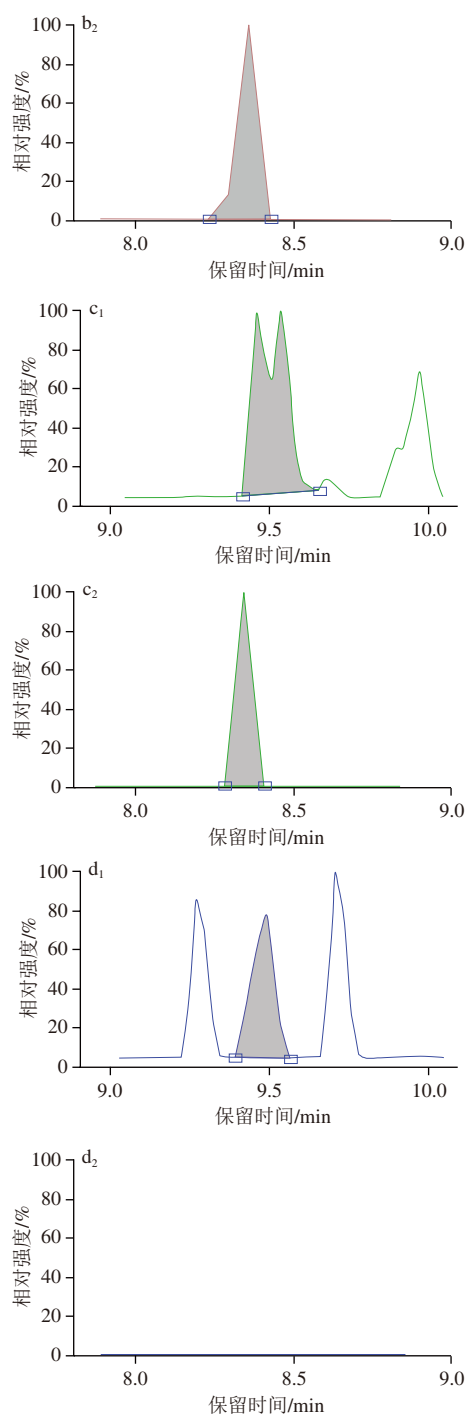
靶向蛋白质组学基于质谱技术，主要包括MRM和PRM两种方法。其中，MRM也称为选择反应监测（selected reaction monitoring, SRM），通常在三重四极杆质谱（triple quadrupole mass spectrometry, QQQ MS）仪上进行，主要包括3个阶段（图1b）：1）第一级四极杆质谱（Q1）扫描筛选出与目标多肽分子质量一致的母离子；2）在第二级四极杆质谱（Q2）对母离子进行碰撞碎裂；3）最后通过第三级四极杆质谱（Q3）采集来自目

标子离子的质谱信号。通过这种方式，MRM技术尽可能地排除了其他离子的干扰，提高了目标多肽的信噪比，进而提高了对目标多肽定性和定量检测的灵敏度和可重复性（表1）。PRM衍生于MRM，是以混合型质谱仪如四极杆-线性轨道阱串联质谱（quadrupole-Orbitrap tandem mass spectrometry, Q-Orbitrap MS/MS）仪和四极杆-飞行时间串联质谱（quadrupole-time of flight tandem mass spectrometry, Q-TOF MS/MS）仪为基础的高分辨率质谱检测平台。与MRM每次执行一次跃迁（母离子和子离子对）不同，PRM通过母离子对每次跃迁执行全扫描，从而同时监测所有子离子（图1c），避免了子离子的选择和优化，使PRM方法开发更容易。此外，与MRM相比，PRM使用的Orbitrap和TOF质谱仪具有更高的分辨率和质量精度，从而提供更高的选择性，改善了目标多肽与背景多肽的分离（图2）。值得指出的是，尽管MRM的选择性较低，但其较高的灵敏度使其仍是许多科学研究的首选方法。

表1 MRM和PRM对比
Table 1 Comparison of MRM and PRM

方法	MRM	PRM
常用仪器	QQQ	Q-Orbitrap、Q-TOF
灵敏度	非常高	高
选择性	中	非常高
重复性	非常高	非常高
方法开发难度	高	中
是否定量	是	是





a. 100 ng/mL; b. 1 ng/mL; c. 0.5 ng/mL; d. 0 ng/mL。下标1. MRM 695.4(y6); 下标2. PRM 695.419 3(y6); 其中数字代表所采集的多肽碎片分子质量/Da, 括号内代表多肽碎裂位置。

图2 采用MRM和PRM模式检测多肽HEIPVLPNR

Fig. 2 Detection of HEIPVLPNR peptide in MRM and PRM modes

靶向蛋白质组学虽然可以进行无标记定量,但由于液相色谱-质谱(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)分析中信号强度的变化,定量的准确性可能不足^[3]。更精确的定量方法需要依赖于稳定同位素标记技术^[6],使用标记的多肽作为内标,基于目标多

肽和内标信号强度对目标蛋白质或多肽进行相对定量和绝对定量分析。

2 靶向蛋白质组学技术在食品安全检测的应用

基于HPLC-MS/MS的靶向蛋白质组学技术具有灵敏度高、特异性强和定量准确性好等优点,在评估食品安全方面发挥着越来越重要的作用^[1]。近5年,靶向蛋白质组学在食品安全领域的相关研究主要集中在动物源性食品掺假鉴别、食物过敏原检测和食源性致病菌及其毒素检测。

2.1 动物源性食品掺假鉴别

近年来,食品掺假问题频繁发生,其中以肉及肉制品的掺假最为普遍^[7]。这种行为不仅威胁着食品供应链的安全,扰乱市场经济,还可能对公众健康造成风险。因此,迫切需要快速、便捷、准确的食物掺假鉴别技术。靶向蛋白质组学近年来在该领域得到广泛应用^[4,8]。

2.1.1 肉及肉制品掺假鉴别

肉及肉制品掺假已成为全世界普遍存在的问题,用低价值的肉掺入到高价值的肉是肉及肉制品掺假的主要方式^[4]。相较于基于基因的食品掺假鉴别技术,靶向蛋白质组学技术具有独特的优势,尤其在深加工肉制品中更加显著^[9-10]。这是因为该技术利用物种特异性多肽进行掺假鉴别,而多肽的热稳定性比DNA更高,能够保证在高度加工或频繁处理的肉制品中不发生降解。Von Bagen等^[11]率先采用MRM方法检测清真牛肉中猪肉和羊肉掺假。Nalazek-Rudnicka等^[12]优化了蛋白提取和固相萃取纯化步骤,提供了一个具有更高重复性和灵敏度的检测流程,成功用于生猪肉和加工猪肉的分析。得益于蛋白质组学和生物信息学技术的发展,越来越多物种特异性多肽被发现,使得基于靶向蛋白质组学的肉及肉制品掺假鉴别技术日益成熟^[13]。Li Yingying等^[14]筛选出47条热稳定性多肽,可用于同时检测肉制品中8种常见掺杂物。张颖颖等^[15]结合主成分分析建立了测定掺假驴肉的LC-MS/MS方法,通过靶向分析猪、驴、马的物种特异性多肽,可准确测定掺假比例低至0.5%的样品。随后,同一研究团队^[16]对猪、牛、羊、鹿、鸡、鸭、火鸡共7种动物进行分析,鉴定出35条物种特异性多肽,并建立了快速LC-MS/MS方法。20种加工肉制品的检测结果显示,共有3份样品与标签不一致,包括牛肉丸掺假和未申报鸡肉的添加。大多数评估肉及肉制品掺假的研究都集中在哺乳动物上^[12,14],只有少数研究关注加工食品中的家禽品种^[17]。Fornal等^[18]筛选出鸡、鸭、鹅的物种特异性多肽,并建立了MRM方法,该方法可以在烟熏和煮熟的法兰克福香肠(由火鸡制成)等深加工食品中鉴别出鸭肉、鹅肉和鸡肉成分。此外,Häfner等^[19]建立了鸡、鸭、鹅、珍珠鸡、鸵鸟、野鸡、鸽子、鹌鹑和火鸡肉的HPLC-MS/MS同时检测方法。

另一种常见的肉及肉制品掺假方式是用更便宜的外来蛋白质代替高价值的肉类蛋白质。最常用的外来蛋白质是大豆蛋白、牛奶蛋白和小麦麸质，这很可能导致消费者接触到非肉类过敏原等问题。2019年，Jira等^[20]率先报道了同时检测肉制品中大麦、玉米、燕麦、大米、黑麦和小麦蛋白质的HPLC-MS/MS方法。随后，Spörl等^[21]建立了香肠中9种豆科植物蛋白质的HPLC-MS/MS检测方法，共筛选出27条热稳定性多肽，其中包括此前鲜见报道的紫花苜蓿、蚕豆、鹰嘴豆和扁豆的物种特异性多肽。同一研究团队^[22-23]利用该技术分别鉴定了肉及肉制品中存在的10种油籽蛋白质和23种不同动植物来源的蛋白质，检出限（limit of detection, LOD）可达0.01%。不同于以往报道，该方法涉及几种非过敏性外来蛋白质，不仅适用于肉及肉制品掺假鉴别，而且适用于检测素食和素食肉类产品的未申报成分^[24]。

目前，大部分方法集中于对肉及肉制品中的掺假成分进行定性分析。然而，食品掺假问题不仅涉及物种掺假，还包括食品原料成分含量的欺诈。因此，准确测定肉及肉制品中的含肉量已成为肉类食品行业的关注重点之一^[8]。Montowska等^[25]建立了一种检测肉制品中掺假成分的绝对定量分析方法。该方法以稳定同位素（¹³C和¹⁵N）标记的多肽作为内标加入到样品中，成功在13个样品中检测到少量未申报的猪肉蛋白。然而，同位素标记多肽的合成成本较高，利用纯肉的多肽溶液构建标准曲线的方法更为普遍。Pan Xiaodong等^[26]建立了一种定量检测肉制品混合物（鸡肉、绵羊和牛肉）中猪肉含量的PRM方法。该方法以生猪肉水解物溶液为外标构建标准曲线，从而计算样品中猪肉的含量，LOD可达0.5%。Prandi等^[27]率先报道了同时定量检测波隆拿肉酱中8种不同肉类的SRM方法。采用纯肉制成的波隆拿肉酱获得多肽，通过多肽信号强度和含肉量构建标准曲线，从而量化不同物种的肉的含量。然而，上述方法均针对物种特异性多肽进行检测，需要知道或至少怀疑掺假成分的来源^[28-29]，因此只能分析有限数量的潜在污染或未申报的成分。近期，Nalazek-Rudnicka等^[30]报道了一种鉴定猪肉和牛肉中掺假成分的相对定量策略。该策略根据猪肉特异性多肽HPGDFGADAQGAMSK、牛肉特异性多肽VLGFHG与全局多肽LFDLR（广泛分布于动物肌肉组织中）之间的比例来确定肉制品中猪肉和牛肉的相对含量。同年，康超娣等^[31]也报道了一种牛肉中掺假成分的相对定量分析方法。首先将纯牛肉分别与纯猪肉和纯鸡肉以不同比例混合，进一步构建标准曲线。结果表明，线性相关系数均大于0.99，LOD可达0.5%。该方法的应用不仅可以准确检测肉及肉制品中掺假成分的相对含量，还可以避免由于蛋白质提取效率、酶活性、仪器状态、加工工艺等不确定性因素的变化而导致实测值与真实值之间的差异。

2.1.2 乳及乳制品掺假鉴别

乳及乳制品由于其消费的广泛性，是最容易受到掺假影响的食品之一^[32]。除了奶牛乳及其制品，常见的还有水牛乳、山羊乳、马乳、驴乳、骆驼乳等。这些产品各具独特的营养价值，但是由于产量低、价格高，常被掺入低价值的奶牛乳或植物蛋白。乳及乳制品中含有大量蛋白质，对其蛋白组成以及活性成分的研究是鉴别掺假乳的有效方法。以下按照食品分类介绍靶向蛋白组学在动物源性食品掺假鉴别领域的最新研究进展（表2）。Russo等^[33]率先使用三重四级杆质谱的MRM采集模式对水牛奶酪中奶牛乳掺假进行定性和定量分析。Nardiello等^[34]利用纳米LC-MC/MS联用技术，以来源于奶牛 β -乳球蛋白和 α_{s1} -酪蛋白的多肽作为评估羊乳中奶牛乳掺假的合适生物标志物。陈雨滢等^[35]建立了一种鉴别奶牛、水牛、牦牛、山羊、绵羊、马、驴和骆驼共8种奶畜乳及其乳制品的MRM分析方法。针对8种奶畜乳品中6种乳蛋白酶解产生的多肽进行分析，最终筛选出13条特异性多肽，成功对市售17个乳制品中的奶源物种进行鉴别。

表2 靶向蛋白质组学技术在食品掺假鉴别的应用					
Table 2 Application of targeted proteomics in food authentication					
食品类别	主要内容	采集模式	内标种类	校准曲线	参考文献
肉及肉制品	检测清真牛肉中马和猪成分	MRM	无	无	[11]
	根据肌红蛋白特征肽丰度差异鉴别生猪肉和加工猪肉的不同部位	MRM	无	无	[12]
	检测狐狸肉中鸭成分	MRM	无	空白食品基质加标猪肉	[13]
	鉴定猪、牛、羊、鸡、鸭、大豆、花生和豌豆的特征肽并建立同时检测方法	MRM	无	无	[14]
	检测驴肉中马和猪成分	MRM	无	无	[15]
	同时检测20种肉制品中猪、牛、羊、鹿、鸡、鸭和火鸡成分	MRM	无	无	[16]
	鉴定珍珠鸡的特征肽，并检测珍珠鸡肉制品中家鸡、火鸡和野鸡成分	MRM	无	空白食品基质加标猪肉	[17]
	鉴定鸡、鸭、鹅的特征肽并检测火鸡肉制品中鸡、鸭、鹅、猪和牛成分	MRM	无	无	[18]
	同时检测42种生肉和肉制品中猪、鸭、鹅、珍珠鸡、鸵鸟、野鸡、鸽子、鹌鹑和火鸡成分	MRM	无	无	[19]
	同时检测香肠中大麦、玉米、燕麦、大米、黑麦和小麦成分	MRM	¹³ C和 ¹⁵ N标记的多肽	空白食品基质加标谷物蛋白	[20]
	同时检测香肠中苜蓿、蚕豆、鹰嘴豆、扁豆、羽扇豆（两种亚种）、豌豆、花生和大豆成分	MRM	无	空白食品基质加标豆科蛋白	[21]
	同时检测香肠中奇亚、椰子、亚麻籽、大麻籽、花生、南瓜、油菜籽、芝麻、大豆和葵花籽成分	MRM	无	空白食品基质加标油籽蛋白	[22]
	同时检测肉制品中23种不同动植物成分	MRM	无	空白食品基质加标外来蛋白	[23]
	定量检测肉制品中鸡、鸭、鹅、猪和牛成分以及大豆、牛奶和蛋清等常见过敏原	MRM	¹³ C和 ¹⁵ N标记的多肽	纯肉的水解物溶液	[25]
	定量检测肉制品中猪肉含量	PRM	无	纯肉的水解物溶液	[26]
	定量检测波隆拿肉酱中鸭、兔、鸡、火鸡、水牛、马、鹿和羊成分	SRM	无	空白食品基质加标猪肉	[27]
	定量检测肉制品中猪肉含量	MRM	¹³ C和 ¹⁵ N标记的多肽	空白食品基质加标猪肉	[28]
	筛选牛特征肽，并定量检测10种牛肉制品中牛肉含量	MRM	无	空白食品基质加标猪肉	[29]

续表2

食品类别	主要内容	采集模式	内标种类	校准曲线	参考文献
乳及乳制品	检测肉制品中猪肉和牛肉的相对含量	MRM	无	无	[30]
	检测牛肉制品中猪肉和鸡肉的相对含量	MRM	无	空白食品基质加标纯肉	[31]
	检测水牛奶酪中奶牛成分	MRM	无	空白食品基质加标纯乳	[33]
	检测羊奶中奶牛乳成分	MRM	无	空白食品基质加标纯乳	[34]
	对17个不同物种来源的市售鲜奶及奶制品进行物种鉴定	MRM	无	空白食品基质加标纯乳	[35]
	定量检测46种市售乳制品中奶牛、水牛、牦牛、山羊、绵羊、驴、马和骆驼成分	PRM	¹³ C和 ¹⁵ N标记的多肽	空白食品基质加标纯乳	[36]
	定量检测骆驼奶和驼奶粉中奶牛、水牛、牦牛、山羊、绵羊、驴和马成分	MRM	无	空白食品基质加标纯乳	[37]
	定量检测鲜奶中奶牛乳成分	MRM	无	空白食品基质加标纯乳	[38]
	定量检测生牛乳中牛乳蛋白，并检测大豆蛋白含量	MRM	¹³ C和 ¹⁵ N标记的多肽	空白食品基质加标纯乳	[39]
	检测蜂蜜中蜂王浆主蛋白(major royal jelly proteins, MRJPs)特征肽	MRM	无	无	[40]
保健类食品	鉴定出MRJPs来源的特征肽，实现蜜露和花蜜的准确区分	MRM	无	空白食品基质加标合成多肽	[41]
	鉴定出mānuka花蜜的特征肽，区分mānuka花蜜和其他植物来源的花蜜	MRM	无	无	[42]
	定量检测70个市售蜂蜜样品，并建立蜂蜜MRJPs含量数据库	MRM	¹³ C和 ¹⁵ N标记的多肽	空白食品基质加标合成多肽	[43]
	鉴定出燕窝及蛋清、干鱼鳔、银耳、煎猪皮共4种掺假物特征肽，并建立定量分析方法	MRM	无	空白食品基质加标掺假物	[44]
	检测16种燕窝原料和6个市售炖煮产品中掺假成分，并建立首个燕窝鉴别蛋白肽段库	MRM	无	合成多肽溶液	[45]
	检测阿胶中猪、牛和马皮源成分	MRM	无	无	[46]
	定量检测阿胶糕中马、牛、羊和猪皮源成分	MRM	无	合成多肽溶液	[47]
	定量检测阿胶中猪皮源成分	MRM	无	合成多肽溶液	[48]
	定量检测阿胶中马、牛和猪皮源成分	MRM	无	合成多肽溶液	[49]
	定量检测阿胶中驴皮源成分	MRM	¹⁵ N标记的多肽	合成多肽溶液	[50]

近年来，许多定量检测掺假乳的方法被报道^[32]。Zhang Huiyan等^[36]建立了基于稳定同位素标记多肽的PRM定量方法，该方法可以区分8种不同奶畜乳品，成功应用于46种市售乳品的检测。此外，古淑青等^[37]建立了基于多肽标志物测定驼奶和驼奶粉中7种动物源性成分的无标记定量方法。向驼奶和驼奶粉中添加不同质量分数的其他奶畜乳，采用HPLC-MS/MS检测多肽标志物的质谱强度，并构建标准曲线。11种市售驼乳和驼乳粉的检测结果表明，1个驼奶粉样品发现奶牛乳掺假，其余样品仅检测出骆驼的物种特异性多肽。近期，Zhang Jiukai等^[38]利用相同方法定量分析了6种非奶牛乳产品中的奶牛乳成分，该方法的LOD为1%，回收率为91.07%~111.75%。Hao Xingkai等^[39]通过Q-TOF MS筛选出5条牛乳特异性多肽，并建立了基于同位素稀释法的牛乳主要蛋白质定量方法。经过验证，每100 g总蛋白中含有70.26 g上述牛乳蛋白。基于此，可检测生牛乳中掺杂的大豆蛋白，LOD为10%。

2.1.3 保健类食品掺假鉴别

功能保健类食品，如蜂产品、燕窝、阿胶等，因为价格高昂，市场上经常出现以次充好的现象，真假难辨^[4]。

一直以来，蜂蜜及其他蜂产品的掺假问题非常严重。基于蛋白质组学和代谢组学的生物标志物检测技术在食品真实性检测领域得到广泛应用，为以MRJPs作为蜂产品真实性检测标志物的研究奠定了基础^[40]。Silva等^[41]首次使用靶向蛋白质组学方法鉴别蜜露和花蜜。作者首先采用Q-TOF MS筛选出6条MRJPs来源的特异性多肽，随后利用QQQ MS的MRM模式对这些多肽进行采集，并结合主成分分析实现蜜露和花蜜的准确区分。除了使用蜜蜂分泌的MRJPs作为生物标志物，蜜源植物的蛋白质也是蜂产品中的主要蛋白质成分。Bong等^[42]通过自下而上的蛋白质组学策略，首次表征了mānuka花蜜的蛋白质组成，并鉴定出12条植物来源的候选特征肽，可用于区分mānuka花蜜和其他植物来源的花蜜。同年，Jiang Weijian等^[43]率先建立了定量检测蜂蜜中MRJPs的LC-MS/MS方法。该方法以¹³C和¹⁵N标记的MRJPs多肽作为内标加入到样品中，对70个真实样品进行定量分析，并构建了蜂蜜MRJPs含量数据库，在蜂蜜真实性鉴定中具有较大应用潜力。

燕窝在我国一直被视为一种药用和保健食品。然而，燕窝资源少、价格贵，经济利益驱动的掺假行为一直是燕窝供应链中的一大问题。常用于燕窝掺假的食物包括银耳、猪皮、蛋清、鱼鳔，由于这些掺假物富含蛋白质，靶向蛋白质组学技术逐渐成为燕窝掺假鉴别强有力的工具。Ma Xueting等^[44]建立了食用燕窝及其掺假物的定量检测方法。作者从4种不同的燕窝样本中鉴定出了共同存在的6种蛋白质，进一步筛选出5条特异性多肽作为燕窝标志物。此外，作者进一步筛选出4种常见掺假物（蛋清、干鱼鳔、银耳、煎猪皮）的特异性多肽。将燕窝分别与掺假物以不同比例混合，进而构建标准曲线。结果表明，线性相关系数均大于0.99，LOD可达1%，回收率为92.06%~118.55%。近期，郭伟恒^[45]利用相同方法对16种燕窝原料和6个市售炖煮产品进行掺假鉴别，并建立了首个燕窝鉴别蛋白肽段库，其中包括燕窝及21种掺假物可能出现的蛋白质和多肽。

阿胶是一种传统的滋阴补血的药食同源类食物，是由马科动物驴的皮经煎煮、浓缩制成的固体胶^[50]。由于驴皮资源短缺，阿胶价格攀升，市场上频繁出现向阿胶中掺入猪皮胶、牛皮胶等低价值胶类的现象。阿胶的主要成分是胶原蛋白在高温条件下不完全水解形成的多肽，其具有物种特异性，这为基于多肽标志物的靶向蛋白质组学在阿胶掺假鉴别的应用奠定了基础。房芳等^[46]利用HPLC-Q-TOF-MS分别对阿胶、猪皮胶、牛皮胶和马皮胶样品进行鉴定，筛选出阿胶异源性物种的特征性多肽，从多肽入手解决阿胶中异源性物种的掺假鉴别问题。随后，多个研究团队^[47-49]建立了阿胶中掺假成分的定量检测方法，通过多肽标准品建立标准曲线，实现市售阿胶中马、牛、羊、猪皮源成分的检测。此外，巩丽萍

等^[50]建立了阿胶中驴源成分的绝对定量方法，采用稳定同位素标记的多肽作为内标在一定程度上消除了基质效应，定量限（limit of quantitation，LOQ）为20 mg/kg，回收率为103.2%~108.3%。

2.2 食物过敏原检测

随着社会经济的持续发展，食物过敏已经成为全球性食品安全问题之一^[3]。目前尚无有效的根治方法，因此过敏原检测与食品包装标识是帮助过敏人群规避摄入过敏原的最佳方式。近5年，得益于过敏原多肽标志物的发现，靶向蛋白质组学技术在食物过敏原检测方面得到广泛应用^[51]，本文接下来将针对常见的食物过敏原介绍相关研究进展（表3）。

表3 靶向蛋白质组学技术在食物过敏原检测的应用

食物过敏原	主要内容	采集模式	内标种类	校准曲线	参考文献
花生	改进蛋白提取和酶解流程，快速定量检测松饼和冰淇淋中花生过敏原	MRM	无	空白食品基质加标过敏原蛋白	[52]
	筛选核桃过敏原特征肽，并定量检测5种加工核桃食品	MRM	¹³ C和 ¹⁵ N标记的多肽	空白食品基质加标过敏原蛋白	[53]
	筛选核桃和杏仁过敏原特征肽，并定量检测15种市售加工食品	MRM	无	空白食品基质加标过敏原蛋白	[54]
坚果	筛选腰果过敏原特征肽，并定量检测饼干、面包、蛋糕、桃酥、巧克力和饮料共6种食品基质中的腰果过敏原	MRM	无	空白食品基质加标过敏原蛋白	[55]
	筛选杏仁过敏原特征肽，并定量检测饮料、饼干和巧克力共3种基质中的杏仁过敏原	MRM	无	空白食品基质加标过敏原蛋白	[56]
	定量检测烘焙大豆粉和豆浆中的大豆过敏原Gly m 4	MRM	无	过敏原蛋白水解物溶液	[57]
	定量检测烘焙发酵豆粕、膨化豆粕及膨化全脂大豆中的大豆过敏原Gly m 5.0101	MRM	无	空白食品基质加标合成多肽	[58]
大豆	筛选大豆过敏原特征肽，并定量检测6种加工大豆食品	PRM	无	空白食品基质加标过敏原蛋白	[59]
	定量检测曲奇和生面团中大豆过敏原	PRM	¹³ C和 ¹⁵ N标记的多肽	过敏原蛋白与载体蛋白的水解物溶液	[60]
	定量检测法兰克福香肠和面包中大豆过敏原	PRM	¹³ C和 ¹⁵ N标记的多肽	过敏原蛋白与载体蛋白的水解物溶液	[61]
麸质	鉴定麸质过敏原特征肽，并定量检测多种食品基质	MRM	¹³ C和 ¹⁵ N标记的多肽	待测食品样本加标过敏原蛋白	[62]
	同时检测加工食品中的荞麦和6种含麸质谷物过敏原	MRM	无	空白食品基质加标过敏原蛋白	[63]
芝麻	评估特征肽的特异性并同时定量检测7种芝麻过敏原	MRM	¹³ C和 ¹⁵ N标记的多肽	空白食品基质加标过敏原蛋白	[64]
	同时定量检测鲜鸡蛋和加工鸡蛋中4种主要蛋清过敏原Gal d 1~4	MRM	无	过敏原蛋白水解物溶液	[65]
鸡蛋	同时定量检测鲜鸡蛋和热加工鸡蛋中蛋清过敏原Gal d 1~4和蛋黄过敏原Gal d 5~6	MRM	无	过敏原蛋白水解物溶液	[66]
	同时定量检测26种市售蛋糕和曲奇中鸡蛋过敏原Gal d 1~6	SRM	¹³ C和 ¹⁵ N标记的多肽	空白食品基质加标过敏原蛋白	[67]
	同时定量检测8种市售食品中牛奶过敏原	MRM	无	空白食品基质加标过敏原蛋白	[68]
牛奶	鉴定奶牛过敏原特征肽，检测热加工食品中牛奶过敏原，并鉴别羊奶中奶牛成分	MRM	无	空白食品基质加标过敏原蛋白	[69]
	同时检测热加工食品中酪蛋白和乳清蛋白	PRM	无	无	[70]
	同时检测热加工食品中酪蛋白和乳清蛋白	PRM	¹³ C和 ¹⁵ N标记的多肽	过敏原蛋白与载体蛋白的水解物溶液	[71]
甲壳类	定量检测20种市售加工肉制品中的虾原肌球蛋白（tropomyosin，TM）	MRM	¹³ C和 ¹⁵ N标记的多肽	空白食品基质加标合成多肽	[72]

续表3

食物过敏原	主要内容	采集模式	内标种类	校准曲线	参考文献
	定量检测8种市售食品中虾TM	MRM	无	空白食品基质加标过敏原蛋白	[73]
	同时检测9种市售加工和预包装水产品中虾TM和精氨酸激酶（arginine kinase，AK）	MRM	¹³ C和 ¹⁵ N标记的多肽	空白食品基质加标合成多肽	[74]
鱼类	定量检测25种市售肉制品和调味料中南美白虾、金枪鱼、大西洋鲑鱼、青蟹和大闸蟹共7种过敏原	MRM	无	空白食品基质加标过敏原蛋白	[75]
	定量检测肉及肉制品中鱼类β型小清蛋白（parvalbumin，PV）	MRM	无	空白食品基质加标合成多肽	[76]
	对比全扫描、SRM和PRM 3种扫描模式，确定SRM灵敏度最高，并定量检测曲奇中鸡蛋、牛奶、花生、榛子和大豆过敏原	SRM	无	空白基质加标过敏原蛋白	[77]
	针对复杂基质优化了样品前处理流程，并在两个不同实验室检测花生、榛子、杏仁、大豆、鸡蛋、牛奶过敏原	MRM	无	无	[78]
	完成巧克力中花生、榛子、杏仁、大豆、鸡蛋、牛奶过敏原定量方法的室内验证	MRM	¹³ C和 ¹⁵ N标记的多肽	空白食品基质加标过敏原蛋白	[79]
	筛选热稳定性特征肽，并同时检测猪肉香肠中大豆、牛奶和鸡蛋过敏原	MRM	¹³ C和 ¹⁵ N标记的多肽	无	[80]
	同时检测猪肉和鱼肉制品中大豆、牛奶、鸡蛋和虾过敏原	PRM	¹³ C和 ¹⁵ N标记的多肽	空白食品基质加标过敏原蛋白	[81]
多种	同时检测30种市售鱼糜产品中的大豆、牛奶和鸡蛋过敏原	MRM	¹³ C和 ¹⁵ N标记的多肽	空白食品基质加标合成多肽	[82]
	优化样品前处理流程，用于同时定量烘焙食品中鸡蛋、牛奶和花生过敏原	MRM	¹³ C和 ¹⁵ N标记的多肽	空白食品基质加标合成多肽	[83]
	利用稳定同位素标记的蛋白质作为内标，定量检测曲奇中牛奶过敏原	SRM	¹⁵ N标记的蛋白质	空白食品基质加标过敏原蛋白	[84]
	利用稳定同位素标记的多肽串联体作为内标，定量检测加工食品中鸡蛋、牛奶、花生和榛子过敏原	MRM	¹³ C和 ¹⁵ N标记的多肽串联体	空白食品基质加标过敏原蛋白	[85]
	结合标准物质添加与同位素标记多肽内标，定量检测8种食品中鸡蛋、牛奶、花生和大豆过敏原	MRM	¹³ C和 ¹⁵ N标记的多肽	待测食品样本加标过敏原蛋白	[86]
	定量检测13种肉酱中虾和大豆过敏原	MRM	无	待测食品样本加标过敏原蛋白	[87]
	结合标准物质添加与稳定同位素标记的多肽串联体内标，定量检测鸡蛋、牛奶、花生和榛子过敏原	MRM	¹³ C和 ¹⁵ N标记的多肽串联体	待测食品样本加标过敏原蛋白	[88]
	开发软件自动识别并校正基质干扰，并定量检测84种市售食品中的鸡蛋、牛奶、花生、芝麻、坚果、大豆和小麦过敏原	MRM	¹³ C和 ¹⁵ N标记的多肽	空白食品基质加标过敏原蛋白	[89]

2.2.1 植物源性过敏原检测

据统计，90%以上的食物过敏都是由花生、坚果、大豆、小麦、鸡蛋、牛奶、甲壳类和鱼类水产品这8类食物引起的^[90]。其中前4种属于植物源性过敏食物，后4种属于动物源性过敏食物。

花生过敏是导致严重过敏的最常见原因之一^[3]。LC-MS/MS法是一种强大的过敏原蛋白/多肽定量工具，特别是在复杂基质中（如高脂肪和多酚的巧克力以及深加工食品肉汤粉）^[77]。Huet等^[91]将花生粉混入原料，从头制备了含过敏原的巧克力和肉汤粉。不同于加标样品，这些样品能够更好地模拟实际食品样品中发生的复杂相互作用和变化，从而提供更加真实的结果。随后，采用高分辨质谱对两种基质中的过敏原蛋白进行分析，共鉴定出花生、榛子、杏仁、大豆、鸡蛋、牛奶约50条特异性多肽^[92]。针对巧克力基质，进一步优化了样品前处理流程，并在两个不同实验室进行验证，确定了最佳的样品前处理方案^[78-79]。同一时期，Nelis等^[52]开

发了一种快速定量检测花生过敏原的MRM方法。该方法优化了蛋白提取和酶解流程,省去了还原、烷基化和样品纯化步骤,有效地将总分析时间从5.5~20 h缩减至2.5 h。该方法在冰淇淋(106.0 ± 15.1 %)和花生松饼(72.7 ± 13.4 %)中具有优异的回收率,灵敏度(LOD=0.25~0.5 mg/kg, LOQ=0.5~1.0 mg/kg)得到大幅提高。

坚果也是食物过敏的最常见原因之一,近年来已经开发了几种MRM方法来检测加工食品中多种坚果过敏原^[93]。Kim等^[53]报道了一种多阶段核桃过敏原特征肽筛选策略,并建立了基于稳定同位素标记多肽内标的MRM定量方法。该策略通过对核桃原料进行非靶向LC-MS/MS分析来发现候选特征肽,随后对加工核桃食品进行靶向LC-MS/MS分析来验证候选特征肽。利用该方法成功检测5种加工食品中的核桃过敏原,LOD为0.3 pg/ μ L, LOQ为0.8 pg/ μ L,回收率为85.1%~103.4%。同年,Torii等^[54]建立了一种可靠、灵敏、可同时检测加工食品中多种坚果过敏原的LC-MS/MS分析方法。除了世界四大坚果(腰果、核桃、杏仁和榛子),近期我国学者报道了其他常见坚果过敏原的定量检测方法。宁亚维等^[55-56]采用Q-Exactive质谱对腰果和松仁进行分析,分别筛选出6条和3条特异性多肽,并建立基于特征肽的腰果和松仁过敏原MRM检测方法。该方法具有较高灵敏度和特异性,为我国食品标签真实性检验及食品中隐性过敏原的检测提供技术支持。

大豆富含蛋白质和氨基酸,是一种重要的植物性蛋白资源,经常被加工成大豆蛋白制品,如大豆粉、大豆分离蛋白、大豆浓缩蛋白、豆浆等。然而,大豆也是常见的食物过敏原之一。因此,对食物中的大豆过敏原进行快速、准确地检测就显得尤为重要^[90]。近年来,已有基于LC-MS/MS的靶向蛋白质组学方法成功应用于检测加工大豆食品中大豆来源的成分^[94]。Yoshimitsu等^[57]建立了基于LC-MS/MS的大豆及加工大豆食品中大豆过敏原Gly m 4定量分析方法。同年,Jia Hongmin等^[58]采用类似方法定量检测烘焙发酵豆粕、膨化豆粕及膨化全脂大豆中的大豆过敏原Gly m 5.0101。虽然目前已经开发了大量基于MRM法的大豆过敏原定量方法,但大多数研究只关注有限种类的大豆蛋白。2020年,李丽芳等^[95]利用Q-TOF MS对大豆的酶解产物进行分析,针对性地从11种大豆过敏原蛋白中筛选出29条特异性多肽,进一步建立了11种大豆过敏原的MRM定性检测方法。然而,上述方法是基于新鲜大豆开发的方法,不适用于加工大豆食品。为了解决这一问题,Chen Shimin等^[59]系统地研究了6种不同加工大豆制品之间的蛋白差异。研究表明,不同类型的加工处理(如热、酸、碱等)对蛋白质结构以及蛋白质溶解度方面造成了一定影响。经过筛选,最终

鉴定出在6种加工大豆制品中具有高丰度和一致性的多肽,以其作为靶标建立了大豆过敏原定量方法。随后,同一研究团队^[60]改进了上述方法,通过加入脱脂奶粉作为载体蛋白构建与基质无关的校准曲线,实现了曲奇和生面团中大豆过敏原的定量检测。近期,该研究团队成功将该方法应用于高脂肪基质(以法兰克福香肠为代表)和高碳水基质(以面包为代表)食品中大豆过敏原的检测^[61]。

根据溶解度可将小麦蛋白分为醇溶蛋白、麦谷蛋白、白蛋白和球蛋白^[93]。小麦麸质主要是由醇溶蛋白和麦谷蛋白组成,因其能够引起乳糜泻和小麦过敏等疾病,近年来备受关注。因此,快速、准确地检测食物中的麸质具有重要意义。除了普通小麦,含麸质谷物还包括所有小麦品种(如斯佩尔特小麦和卡姆特小麦)、黑麦、大麦及其杂交品种^[93]。Henrottin等^[62]开发了一种超高效液相色谱(ultra-high performance liquid chromatography, UPLC)-MS/MS法用于同时分析加工食品中的麸质及其他过敏原。作者对含麸质谷物面粉进行分析,共鉴定出2条普遍存在于含麸质谷物的特征肽,以及各谷物特有的多肽。该方法可以从7种谷物中识别和区分麸质,并成功应用于多种食品基质,包括面粉、热加工食品(如米糕、调味酱)、经过发酵的更复杂的样品(如啤酒)。尽管荞麦不含麸质,但是越来越多研究表明荞麦经常受到麸质污染,这可能源于生产和运输过程中不同谷物之间的接触^[96]。因此,Seki等^[63]建立了同时检测加工食品中荞麦和含麸质谷物(普通小麦、斯佩尔特小麦、黑麦、大麦和燕麦等)的分析方法。

根据流行病学、效力和过敏反应严重程度等,联合国粮农组织和世界卫生组织将芝麻替代大豆成为“八大”食物过敏原新成员,并建议将其列为强制性过敏原标签法规中的优先过敏原^[97]。2020年,Ma Xiuli等^[64]建立了一种基于LC-MS/MS MRM模式的芝麻过敏原定性和绝对定量方法。作者首先使用多种常见的植物种子提取物评估了芝麻过敏原特征肽的特异性。结果表明,所选特征肽的特异性较好,并针对7种芝麻过敏原的特征肽建立了MRM检测方法,该方法的LOD为0.1~140.0 fmol/ μ L, LOQ为0.4~400 fmol/ μ L。

2.2.2 动物源性过敏原检测

鸡蛋富含蛋白质、脂肪和维生素,是日常饮食中常见的食物^[2]。然而,鸡蛋是导致食物过敏的主要原因,尤其在婴儿和儿童中高发。因此,建立一种可靠、高效且灵敏的食品中鸡蛋过敏原检测分析方法至关重要。在过去的5年中,已经开发了几种MRM方法检测多种鸡蛋过敏原,如来自蛋清的卵白蛋白(又称为Gal d 2)和溶菌酶(又称为Gal d 4)^[98-99]。Kiyota等^[65]率先建立了同时定量4种主要蛋清过敏原(Gal d 1~4)的LC-MS/MS方

法。该方法LOQ为9.77~39.1 ng/mL, 在新鲜鸡蛋和加工鸡蛋中Gal d 1~4的回收率为68.3%~121.3%, 组内变异系数为1.5%~15.7%, 组间变异系数为2.4%~38.1%, 具有较高的灵敏度、准确性和重复性。目前, 大部分研究主要集中在蛋清过敏原蛋白Gal d 1~4, 很少关注蛋黄中的Gal d 5、Gal d 6和其他过敏原。近期, Kiyota等^[66]报道了同时检测蛋清过敏原Gal d 1~4和蛋黄过敏原Gal d 5、Gal d 6的MRM方法。该方法改进了文献报道的方法, 使用含有表面活性剂和还原剂的蛋白提取缓冲液, 可溶解热加工鸡蛋食品中变性和聚沉的鸡蛋过敏原。同一时期, Yang Shupeng等^[67]也报道了同时定量6种鸡蛋过敏原(Gal d 1~6)的LC-MS/MS方法。作者系统地对比了4种不同的校准策略, 结果表明, 以过敏原蛋白为校准剂, 以稳定同位素标记多肽为内标的基质匹配校准曲线的定量结果最为准确。该方法具有较高的灵敏度、准确性和重复性, 并成功地应用于26种市售蛋糕和曲奇的分析。

牛奶是最常见、最广泛的食物过敏原之一^[90]。牛奶中的蛋白质可分为两大类: 酪蛋白(约占80%)和乳清蛋白(约占20%)。免疫学方法目前是检测牛奶过敏原的常规手段。然而, 该方法难以检测热加工食品中变性的牛奶过敏原蛋白, 近年来已经开发了许多基于LC-MS/MS的方法来解决这一问题^[68-69]。Ramachandran等^[70]开发了一种靶向质谱方法同时检测热加工食品中酪蛋白和乳清蛋白过敏原。作者采用Q-Orbitrap MS对烘焙饼干进行蛋白质组学分析, 共鉴定出6条热稳定性高的特异性多肽, 分别来自于4种酪蛋白和2种乳清蛋白。随后建立了PRM方法, 并对烘焙饼干中牛奶过敏原进行检测, LOD可达1 mg/mL。近期, 同一研究团队^[71]改进了文献报道的方法, 通过加入载体蛋白(如乳清粉)构建与基质无关的校准曲线。结果表明, 该曲线与空白食品基质制备的基质匹配校准曲线高度重合, 实现了在烘焙饼干、曲奇饼、巴氏消毒饮料、黑巧克力等热加工食品中酪蛋白和乳清蛋白过敏原的定量检测。

水产品中甲壳类(如虾、螃蟹)和鱼类(如鳕鱼、大西洋鲑鱼)是我国常见的食物过敏原。目前, 关于水产品过敏原的靶向蛋白质组学研究主要集中在鱼类主要过敏原PV、甲壳类泛过敏原TM和AK^[72,75]。Sun Lirui等^[76]通过对胰蛋白酶消化条件和色谱参数的优化, 建立了 β -PV的LC-MS/MS定量检测方法, 该方法对复杂食品基质中 β -PV的LOQ为0.1 μ g/g。Wang Jianhua等^[73]采用MRM方法定量检测食物中的虾过敏原蛋白TM。该方法优化了TM的提取条件及酶解条件, 标准曲线线性良好, 线性相关系数大于0.99, 回收率高达91%~109%, LOQ为1.6 mg/kg。2022年, Li Huan等^[74]率先报道了一种基于稳定同位素标记多肽内标的同时检测TM和AK的UPLC-MS/MS方法。作者首先筛选出TM和AK的特异性多肽,

然后基于这些特征肽和相应的同位素标记多肽内标建立了MRM方法。该方法具有较高的准确度, 回收率为94.11%~102.16%, 并成功应用于9种市售食品中虾过敏原的检测。结果表明, 所有非甲壳类食品中TM和AK均为阴性, 而明确申报为甲壳类的食品样品TM和AK均呈阳性。在怀疑含有甲壳类动物的食品样本中, 检测到TM和AK含量较低, 说明在生产过程中可能存在交叉污染。综上所述, MRM方法在检测加工或预包装食品中的鱼类和甲壳类过敏原方面具有较大潜力。

2.2.3 食物过敏原定量检测新方法

鉴于人们对基于液相色谱-串联质谱的食品过敏原检测和定量方法的兴趣日益增加, 美国分析化学家协会(Association of Official Analytical Chemists, AOAC)于2016年发布了国际分析指南^[100], 规定了全蛋、牛奶、花生和榛子过敏原检测方法所要达到的性能要求: 回收率为60%~120%, 相对标准偏差为20%。回顾文献发现, 已报道的检测方法同时满足这些要求非常困难。因此, 近5年来, 许多新的食物过敏原定量检测方法被相继报道^[2]。

目前, 常见的过敏原定量策略主要有两种: 无标记定量法和使用稳定同位素标记的多肽或蛋白质作为内标的定量法。第一种方法是通过向空白食品基质加入不同浓度的过敏原或合成多肽, 采用相同的样品前处理流程并绘制外部校准曲线, 进而确定样品中目标过敏原的浓度^[77]。从理论上讲, 为了消除食品基质对样品前处理、色谱分离、质谱电离和检测的影响, 应在与待测样品匹配或非常相似的空白食品基质中绘制外部校准曲线。然而, 由于实际样品来源广泛、种类繁多, 这一要求并不总能被满足。第二种方法是在样品前处理的不同阶段(如提取、消化、纯化或进样之前)引入稳定同位素标记的多肽作为内标^[83]。尽管该方法可以补偿样品前处理过程中的分析物损失和各种基质效应, 但是却难以消除蛋白质消化不完全而造成的损失, 因为内标多肽不需要经过酶消化释放^[6,101]。

为了解决这一问题, Asher Newsome等^[84]报道了一种基于¹⁵N标记的 α_{s1} -酪蛋白检测曲奇中牛奶过敏原的方法。但是同位素标记蛋白合成难、价格贵, 限制了该方法进一步的应用。2020年Gavage等^[85]报道了一种以¹³C和¹⁵N标记的多肽串联体(或称为同位素标记的长多肽)作为内标的食物过敏原定量检测方法。作者设计并合成了由19个多肽组成的多肽串联体, 研究表明, 待测物和内标峰面积之间的信号比都是恒定的, 从而实现了饼干、巧克力和未烘烤的冻干曲奇中4种过敏原的定量检测。这种策略平衡了同位素标记的蛋白质和多肽, 能够较好地校正基质效应和消化步骤的影响^[102]。另一种解决方法是结合标准物质添加与同位素标记多肽内标^[86]。不同于

常见的无标记定量方法，该方法基于待测样品构建外部校准曲线。首先向待测样品中添加同位素标记的多肽内标和不同浓度的过敏原标准品，随后根据LC-MS/MS响应强度和添加过敏原标准品浓度构建外部校准曲线。该曲线为不经过原点的直线，斜率反映了校准后过敏原浓度与质谱响应强度之间的线性关系，截距反映了待测样品中初始过敏原含量。因此，计算截距与斜率的比值即可得出待测样品中初始过敏原含量。Planque等^[86]对比了这一新方法和传统的同位素标记多肽内标法的优劣。结果表明，该方法显著提高了回收率，牛奶、鸡蛋、大豆和花生的回收率分别为 $(103 \pm 5)\%$ 、 $(103 \pm 4)\%$ 、 $(107 \pm 4)\%$ 和 $(100 \pm 1)\%$ ，均满足AOAC要求。随后，不同研究团队^[87-88]利用类似方法检测加工食品中的多种过敏原含量，再次证明了该策略的优越性。此外，Croote等^[89]率先利用计算机帮助消除食品基质导致的干扰。在84种不同的食品中，作者发现了食品基质干扰的模式，如谷物中的小麦、含巧克力产品中的牛奶、面包和玉米粉中的大豆等。基于此，作者开发了一个基于Python语言的免费软件MADIC (MAtrix-Dependent Interference Correction)，可以自动识别和校正食品基质导致的干扰，并将其应用于多种过敏原的检测。

以上研究表明，内标在定量食物基质中的过敏原中是必需的。另外，根据AOAC指南的要求，目前最佳的方法是对每种类型的食品样品使用不同的外部校准曲线^[103]，从而确保回收率在60%~120%之间。值得注意的是，Planque等^[104]尝试在样品消化后引入稳定同位素标记的内标多肽，在曲奇、冰淇淋和肉酱3种不同基质中获得了重合的外部标准曲线。这一结果鼓舞了更多科学家致力于开发能够消除样品提取和消化过程干扰的新策略。同时，未来的研究仍需探讨是否可以通过使用同一条外部校准曲线来定量所有类型的食品样品，以实现过敏原的准确定量。

2.3 食源性致病菌及其毒素检测

食源性致病菌及其毒素是食品安全的重大隐患，不仅对国民健康造成极大的危害，而且给经济和社会发展带来巨大的负面影响。

在所有食源性疫情中，约有10%由细菌毒素引起^[105]。常见的细菌毒素包括蜡样芽孢杆菌的呕吐毒素和腹泻毒素、肉毒梭状芽孢杆菌的神经毒素 (botulinum neurotoxins, BoNTs)、产气荚膜梭菌的毒素以及金黄色葡萄球菌和其他葡萄球菌产生的肠毒素 (staphylococcal enterotoxins, SEs)。这些细菌毒素大多具有较好的热稳定性，无法通过简单加热去除。因此，检测食品中可能存在的细菌毒素十分必要。近5年来，许多研究报道了检测食品中细菌毒素的LC-MS/MS方法^[105-106]，表4总结了相关研究进展。Masquelier等^[107]建立了一种基于LC-MS/MS的靶向分析方法来定量检测食物中呕吐毒素Cereulide

(一种由蜡样芽孢杆菌产生的十二肽)。该方法以¹³C₆-cereulide作为内标，具有较高灵敏度，LOD为0.1 μg/kg，LOQ为0.5 μg/kg。Koike等^[108]开发了一种含有BoNTs部分氨基酸序列的同位素标记蛋白，并结合LC-MS/MS法检测蜂蜜中BoNTs。此外，Duracova等^[109]建立了一种针对6种产气荚膜梭菌外毒素的PRM检测方法。Koike等^[110]开发了一种基于同位素标记多肽内标的金黄色葡萄球菌一型肠毒素绝对定量方法。该方法准确度为80%~82%，LOQ为10 μg/kg。近期，一种结合免疫磁珠富集的LC-MS/MS方法成功地同时定量测定了8种最常见的金黄色葡萄球菌肠毒素^[111]。该方法在乳制品中的LOQ低至0.1 ng/g，并在金黄色葡萄球菌食物中毒暴发期间收集的实际样品中进行了验证。

表4 靶向蛋白质组学技术在食源性致病菌检测的应用

Table 4 Application of targeted proteomics in foodborne pathogen detection

目标致病菌	主要内容	采集模式	内标种类	校准曲线	参考文献
蜡样芽孢杆菌	定量检测熟米饭中呕吐毒素	MRM	¹³ C标记的多肽	合成多肽溶液	[107]
肉毒梭状芽孢杆菌	利用同位素标记蛋白作为内标，定量检测蜂蜜中肉毒毒素	MRM	¹⁵ N标记的多肽串联体	空白食品基质加标合成多肽	[108]
产气荚膜梭菌	鉴定6种外毒素特征肽，并定量检测牛奶	PRM	¹³ C和 ¹⁵ N标记的多肽	毒素蛋白的水解物溶液	[109]
金黄色葡萄球菌	利用同位素标记多肽作为内标，定量检测牛奶中肠毒素	MRM	¹³ C和 ¹⁵ N标记的多肽	毒素蛋白的水解物溶液	[110]
金黄色葡萄球菌	结合免疫磁珠富集，同时定量检测乳制品中8种肠毒素	PRM	¹³ C和 ¹⁵ N标记的多肽	空白食品基质加标毒素蛋白	[111]
炭疽芽孢杆菌	结合免疫磁珠富集，检测牛奶中炭疽芽孢杆菌	MRM	¹³ C和 ¹⁵ N标记的多肽	空白食品基质加标活菌	[112]
鼠疫耶尔森菌	结合免疫磁珠富集，检测牛奶中鼠疫耶尔森菌	MRM	¹³ C和 ¹⁵ N标记的多肽	空白食品基质加标活菌	[113]
金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌	结合磁性纳米颗粒，检测果汁和生菜中金黄色葡萄球菌和大肠埃希氏菌	SRM	无	无	[114]
金黄色葡萄球菌	检测牛奶中金黄色葡萄球菌	MRM	¹³ C和 ¹⁵ N标记的多肽	空白食品基质加标活菌	[115]

除了细菌毒素，食源性致病菌本身也是引起人类食物中毒的重要原因。理论上，如果某致病菌在蛋白酶解后具有区别于其他微生物的特异性多肽序列，就能够利用靶向蛋白质组学技术检测这些特征肽，实现目标致病菌的灵敏和可靠检测。近年来，一种检测致病菌的新策略被提出，即将致病菌的检测转化为对其特征肽的检测，结合靶向蛋白质组学技术的优势实现目标致病菌的快速、准确检测^[116]。尽管靶向蛋白质组学技术在细菌感染诊断方面已经取得成功^[117-122]，但是在食品中的应用相对较少。不同于临床样本（如血液、肺泡灌洗液、脑脊液、尿液、唾液等体液），食品基质多为固体，并且存在大量蛋白质和杂菌干扰，这对检测方法的灵敏度提出了更高的要求^[123]。通过免疫磁珠预先富集目标致病菌，可显著提高质谱检测的灵敏度和特异性，目前已有研究报道了检测牛奶中致病菌的MRM方法。Chenau等^[112]通过对比炭疽芽孢杆菌和其亲缘物种蜡样芽孢杆菌的酸

溶性小孢子蛋白氨基酸序列,发现了两处单氨基酸位点差异,通过蛋白酶解可得到不同的多肽片段,并以此建立MRM方法。进一步地,利用免疫磁珠抓取目标致病菌,该方法在牛奶和土壤样本对炭疽芽孢杆菌的LOD均为 7×10^3 个/mL。同一研究团队^[113]通过对鼠疫耶尔森菌的pFra、pPla质粒蛋白序列进行分析,得出物种特异性的多肽序列,建立了结合免疫磁珠法的MRM方法。该方法在牛奶和土壤样本的LOD分别为 2×10^4 CFU/mL和 4.5×10^5 CFU/mL。类似地,Chen等^[114]结合磁性纳米颗粒和SRM方法,鉴定了果汁和生菜中的金黄色葡萄球菌和大肠埃希氏菌。Zhao Hong等^[5,115]采用MRM方法同时检测食品中金黄色葡萄球菌及其肠毒素。与其他研究不同的是,该研究是基于细菌全蛋白质组分析,并证明了靶向蛋白质组学技术在复杂食品基质中检测致病菌的可行性,有望成为一种不依赖生物化学鉴定的快速筛查方法。

综上所述,靶向蛋白质组学技术在食源性致病菌检测方面的应用起步较晚,未来还可以从以下几个方面着手,推动该技术的发展。一是开发富集和分离目标致病菌的新方法。尽管目前常用的免疫磁珠分离法具有高效快速、操作简单等优点,但是抗体价格昂贵,且易与其他杂菌交叉反应,选择性增菌和密度梯度离心等方法可能是潜在的替代方案。二是优化细菌蛋白提取流程,提高蛋白提取效率。相较于细胞,细菌具有细胞壁结构,开发更加温和、高效的细菌蛋白提取方法十分必要。三是挖掘其他食源性致病菌特征肽。随着自下而上的蛋白质组学和生物信息学技术的进步,可以更全面地研究致病微生物的特征肽。近5年来,沙门氏菌^[123]、假单胞菌属^[124]、常见腐生细菌^[125-126]的物种特异性多肽被陆续报道,有望推动MRM技术在更多食源性致病菌检测的应用。此外,该技术未来还可以拓展到检测其他致病微生物,如病毒、真菌、寄生虫等。

3 结 语

近年来,靶向蛋白质组学在食品安全检测领域的应用越来越广泛。与现有的基因技术和免疫学技术相比,这种方法具有高特异性、高重复性和高通量的优势。因此,MRM技术和PRM技术已成为研究食品相关蛋白质的定性和定量的重要工具,主要应用在动物源性食品掺假鉴别、食物过敏原检测、食源性致病菌及其毒素检测方面。在分析复杂食品样品时,高分辨率分析和精确测量十分必要,而基于高分辨质谱的PRM技术能够更好地满足这些要求。然而,在食品安全检测领域,PRM技术的应用仍处于起步阶段,相关报道较少。另一个需要考虑的因素是开发检测方法所需的时间。当需要快速筛查食品样本时,PRM技术具有较大优势,因为不需要优化母离子和子离子对。因此,PRM技术可能会受到越来越多研究人员的青睐。

参考文献:

- [1] VALLETTA M, RAGUCCI S, LANDI N, et al. Mass spectrometry-based protein and peptide profiling for food frauds, traceability and authenticity assessment[J]. Food Chemistry, 2021, 365: 130456. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.130456.
- [2] 蒋易蓉,任一平,陆柏益. 靶向蛋白质组学质谱技术在食物过敏原定量检测中的应用[J]. 中国食品学报, 2020, 20(1): 302-310. DOI:10.16429/j.1009-7848.2020.01.039.
- [3] AHSAN N, RAO R S P, GRUPPUSO P A, et al. Targeted proteomics: current status and future perspectives for quantification of food allergens[J]. Journal of Proteomics, 2016, 143: 15-23. DOI:10.1016/j.jpro.2016.04.018.
- [4] 王冰峰,徐雷,徐贞贞,等. 液相色谱-高分辨质谱技术在食品掺假鉴别研究中的应用[J]. 食品科学, 2021, 42(7): 301-310. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200325-371.
- [5] 赵宏,王玉迎,赵良娟,等. 金黄色葡萄球菌候选特征肽的靶向分析[J]. 分析化学, 2020, 48(7): 921-927. DOI:10.19756/j.issn.0253-3820.191703.
- [6] KORTE R, OBERLEITNER D, BROCKMEYER J. Determination of food allergens by LC-MS: impacts of sample preparation, food matrix, and thermal processing on peptide detectability and quantification[J]. Journal of Proteomics, 2019, 196: 131-140. DOI:10.1016/j.jpro.2018.11.002.
- [7] ZIA Q, ALAWAMI M, MOKHTAR N F K, et al. Current analytical methods for porcine identification in meat and meat products[J]. Food Chemistry, 2020, 324: 126664. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.126664.
- [8] 张颖颖,康超娣,张明悦,等. 蛋白质组学在肉类真实性鉴别中的应用研究进展[J]. 食品科学, 2022, 43(5): 286-294. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20201206-065.
- [9] 李莹莹,康超娣,张颖颖,等. 牛肌红蛋白热加工过程中多肽稳定性影响因素分析及其在真实性鉴别中的应用[J]. 食品科学, 2020, 41(19): 1-8. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200327-405.
- [10] PRANDI B, LAMBERTINI F, FACCINI A, et al. Mass spectrometry quantification of beef and pork meat in highly processed food: application on Bolognese sauce[J]. Food Control, 2017, 74: 61-69. DOI:10.1016/j.foodcont.2016.11.032.
- [11] VON BARGEN C, DOJAHN J, WAIDELICH D, et al. New sensitive 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): 11986-11994. DOI:10.1021/jf404121b.
- [12] 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: 367-374. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.01.007.
- [13] ZHANG Y Y, LIU M Y, WANG S W, et al. Identification and quantification of fox meat in meat products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2022, 372: 131336. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.131336.
- [14] LI Y Y, ZHANG Y Y, LI H C, et al. Simultaneous determination of heat stable peptides for eight animal and plant species in meat products using UPLC-MS/MS method[J]. Food Chemistry, 2018, 245: 125-131. DOI:10.1016/j.foodchem.2017.09.066.
- [15] 张颖颖,李莹莹,李石磊,等. 液相色谱-串联质谱法鉴别驴肉真伪[J]. 中国食品学报, 2020, 20(12): 294-301. DOI:10.16429/j.1009-7848.2020.12.035.

- [16] ZHANG M Y, LI Y Y, ZHANG Y Y, et al. Rapid LC-MS/MS method for the detection of seven animal species in meat products[J]. Food Chemistry, 2022, 371: 131075. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.131075.
- [17] STACHNIUK A, SUMARA A, MONTOWSKA M, et al. Peptide markers for distinguishing Guinea fowl meat from that of other species using liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2021, 345: 128810. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.128810.
- [18] FORNAL E, MONTOWSKA M. Species-specific peptide-based liquid chromatography-mass spectrometry monitoring of three poultry species in processed meat products[J]. Food Chemistry, 2019, 283: 489-498. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.01.074.
- [19] HÄFNER L, KALKHOF S, JIRA W. Authentication of nine poultry species using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Control, 2021, 122: 107803. DOI:10.1016/j.foodcont.2020.107803.
- [20] JIRA W, MÜNCH S. A sensitive HPLC-MS/MS screening method for the simultaneous detection of barley, maize, oats, rice, rye and wheat proteins in meat products[J]. Food Chemistry, 2019, 275: 214-223. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.09.041.
- [21] SPÖRL J, SPEER K, JIRA W. A UHPLC-MS/MS method for the detection of meat substitution by nine legume species in emulsion-type sausages[J]. Foods, 2021, 10(5): 947. DOI:10.3390/foods10050947.
- [22] SPÖRL J, SPEER K, JIRA W. Simultaneous mass spectrometric detection of proteins of ten oilseed species in meat products[J]. Foods, 2022, 11(14): 2155. DOI:10.3390/foods11142155.
- [23] SPÖRL J, SPEER K, JIRA W. A rapid LC-MS/MS multi-method for the detection of 23 foreign protein sources from legumes, oilseeds, grains, egg and milk in meat products[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2023, 124: 105628. DOI:10.1016/j.jfca.2023.105628.
- [24] HÄFNER L, BROCKMEYER J, HAASE I, et al. Identification of cross-species marker peptides for the detection of mammalian and poultry meat in vegan and vegetarian foods[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(33): 12597-12608. DOI:10.1021/acs.jafc.3c01100.
- [25] MONTOWSKA M, FORNAL E. Absolute quantification of targeted meat and allergenic protein additive peptide markers in meat products[J]. Food Chemistry, 2019, 274: 857-864. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.08.131.
- [26] PAN X D, CHEN J, CHEN Q, et al. Authentication of pork in meat mixtures using PRM mass spectrometry of myosin peptides[J]. RSC Advances, 2018, 8(20): 11157-11162. DOI:10.1039/c8ra00926k.
- [27] 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: 15-24. DOI:10.1016/j.foodcont.2018.10.016.
- [28] LI Y Y, ZHANG Y Y, KANG C D, et al. Assessment of carbonic anhydrase 3 as a marker for meat authenticity and performance of LC-MS/MS for pork content[J]. Food Chemistry, 2021, 342: 128240. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.128240.
- [29] KANG C D, ZHANG Y Y, ZHANG M Y, et al. Screening of specific quantitative peptides of beef by LC-MS/MS coupled with OPLS-DA[J]. Food Chemistry, 2022, 387: 132932. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.132932.
- [30] NALAZEK-RUDNICKA K, KŁOSOWSKA-CHOMICZEWSKA I E, BROCKMEYER J, et al. Relative quantification of pork and beef in meat products using global and species-specific peptide markers for the authentication of meat composition[J]. Food Chemistry, 2022, 389: 133066. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.133066.
- [31] 康超娣, 王守伟, 张颖颖, 等. 液相色谱-串联质谱法对牛肉中掺假成分的相对定量分析[J]. 食品科学, 2022, 43(4): 270-276. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20210410-135.
- [32] MAFRA I, HONRADO M, AMARAL J S. Animal species authentication in dairy products[J]. Foods, 2022, 11(8): 1124. DOI:10.3390/foods11081124.
- [33] RUSSO R, SEVERINO V, MENDEZ A, et al. Detection of buffalo mozzarella adulteration by an ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry methodology[J]. Journal of Mass Spectrometry, 2012, 47(11): 1407-1414. DOI:10.1002/jms.3064.
- [34] NARDIELLO D, NATALE A, PALERMO C, et al. Milk authenticity by ion-trap proteomics following multi-enzyme digestion[J]. Food Chemistry, 2018, 244: 317-323. DOI:10.1016/j.foodchem.2017.10.052.
- [35] 陈雨滢, 任一平, 王丽丽, 等. 靶向蛋白质组学技术在多物种奶及其奶制品鉴别中的应用研究[J]. 分析化学, 2021, 49(9): 1523-1541. DOI:10.19756/j.issn.0253-3820.201768.
- [36] ZHANG H Y, ABDALLAH M F, ZHANG J J, et al. Comprehensive quantitation of multi-signature peptides originating from casein for the discrimination of milk from eight different animal species using LC-HRMS with stable isotope labeled peptides[J]. Food Chemistry, 2022, 390: 133126. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.133126.
- [37] 古淑青, 陈念念, 曾静, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法鉴定驼乳及其制品中的动物源性成分[J]. 色谱, 2024, 42(1): 13-23. DOI:10.3724/SP.J.1123.2023.07027.
- [38] ZHANG J K, WEI L Y, MIAO J L, et al. Authenticity identification of animal species in characteristic milk by integration of shotgun proteomics and scheduled multiple reaction monitoring (MRM) based on tandem mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2024, 436: 137736. DOI:10.1016/j.foodchem.2023.137736.
- [39] HAO X K, FU L L, SHAO L L, et al. Quantification of major milk proteins using ultra-performance liquid chromatography tandem triple quadrupole mass spectrometry and its application in milk authenticity analysis[J]. Food Control, 2022, 131: 108455. DOI:10.1016/j.foodcont.2021.108455.
- [40] 谢博, 傅红, 杨方. UPLC-Q-Exactive四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用鉴别掺假蜂蜜[J]. 食品工业科技, 2020, 41(2): 244-251. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2020.02.039.
- [41] SILVA B, COSTA A C O, TCHEWONPI S S, et al. Comparative quantification and differentiation of bracinga (*Mimosa scabrella* Benth) honeydew honey proteins using targeted peptide markers identified by high-resolution mass spectrometry[J]. Food Research International, 2021, 141: 109991. DOI:10.1016/j.foodres.2020.109991.
- [42] BONG J, MIDDLEDITCH M, LOOMES K M, et al. Proteomic analysis of honey. identification of unique peptide markers for authentication of NZ mānuka (*Leptospermum scoparium*) honey[J]. Food Chemistry, 2021, 350: 128442. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.128442.
- [43] JIANG W J, YING M R, ZHANG J J, et al. Quantification of major royal jelly proteins using ultra performance liquid chromatography tandem triple quadrupole mass spectrometry and application in honey authenticity[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2021, 97: 103801. DOI:10.1016/j.jfca.2021.103801.
- [44] MA X T, ZHANG J K, LIANG J Z, et al. Authentication of Edible Bird's Nest (EBN) and its adulterants by integration of shotgun proteomics and scheduled multiple reaction monitoring (MRM) based on tandem mass spectrometry[J]. Food Research International, 2019, 125: 108639. DOI:10.1016/j.foodres.2019.108639.

- [45] 郭伟恒. 基于液质联用技术的燕窝特征蛋白肽段鉴定与定量分析[D]. 兰州: 兰州大学, 2023. DOI:10.27204/d.cnki.glzhu.2023.003630.
- [46] 房芳, 张九凯, 马雪婷, 等. 基于特征肽段的阿胶中异源性物种鉴别[J]. 食品科学, 2019, 40(16): 267-273. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180927-293.
- [47] 张静娴, 胡青, 董洪霜, 等. 超高效液相色谱-三重四级杆质谱法用于阿胶糕类食品中阿胶的鉴别及马、牛、羊、猪皮源成分的检测[J]. 世界中医药, 2019, 14(4): 828-832. DOI:10.3969/j.issn.1673-7202.2019.04.008.
- [48] 谢强胜, 高天阳, 孙铜, 等. 基于酶解法采用超高效液相色谱-串联质谱法检测阿胶、黄明胶、鹿角胶中猪皮特征肽[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(1): 166-171. DOI:10.16155/j.0254-1793.2022.01.19.
- [49] ZHANG J J, WU M H, MA Z G, et al. Species-specific identification of donkey-hide gelatin and its adulterants using marker peptides[J]. PLoS ONE, 2022, 17(8): e0273021. DOI:10.1371/journal.pone.0273021.
- [50] 巩丽萍, 石峰, 宿书芳, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定阿胶中的驴皮源成分[J]. 色谱, 2021, 39(11): 1255-1260. DOI:10.3724/SP.J.1123.2021.02003.
- [51] PILOLLI R, NITRIDE C, GILLARD N, et al. Critical review on proteotypic peptide marker tracing for six allergenic ingredients in incurred foods by mass spectrometry[J]. Food Research International, 2020, 128: 108747. DOI:10.1016/j.foodres.2019.108747.
- [52] NELIS J L D, BROADBENT J A, BOSE U, et al. Targeted proteomics for rapid and robust peanut allergen quantification[J]. Food Chemistry, 2022, 383: 132592. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.132592.
- [53] KIM K, KIM Y, LEE H N, et al. Discovery, verification, and validation of walnut protein marker peptides using LC-MS approaches[J]. Food Chemistry, 2023, 429: 136889. DOI:10.1016/j.foodchem.2023.136889.
- [54] TORII A, SEKI Y, ARIMOTO C, et al. Development of a simple and reliable LC-MS/MS method to simultaneously detect walnut and almond as specified in food allergen labelling regulations in processed foods[J]. Current Research in Food Science, 2023, 6: 100444. DOI:10.1016/j.crf.2023.100444.
- [55] 宁亚维, 杨正, 马俊美, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测食品中腰果过敏原[J]. 食品科学, 2023, 44(4): 329-336. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220411-119.
- [56] 宁亚维, 周泓鑫, 杨正, 等. UPLC-MS/MS法检测3种食品中杏仁过敏原[J]. 食品科学, 2024, 45(1): 247-253. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200419-248.
- [57] YOSHIMITSU M, KIYOTA K, KAJIMURA K, et al. Development of an LC-MS/MS-based analytical method for quantification of soybean allergen Gly m 4 in soybean grains and processed foods[J]. Food and Agricultural Immunology, 2019, 30(1): 25-33. DOI:10.1080/09540105.2018.1540553.
- [58] JIA H M, ZHOU T J, ZHU H, et al. Quantification of Gly m 5.0101 in soybean and soy products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Molecules, 2018, 24(1): 68. DOI:10.3390/molecules24010068.
- [59] CHEN S M, YANG C T, DOWNS M L. Detection of six commercially processed soy ingredients in an incurred food matrix using parallel reaction monitoring[J]. Journal of Proteome Research, 2019, 18(3): 995-1005. DOI:10.1021/acs.jproteome.8b00689.
- [60] CHEN S M, YANG C, DOWNS M. Targeted mass spectrometry quantification of total soy protein residues from commercially processed ingredients for food allergen management[J]. Journal of Proteomics, 2021, 239: 104194. DOI:10.1016/j.jprot.2021.104194.
- [61] KRAGER J, BAUMERT J L, DOWNS M L. Quantification of soy-derived ingredients in model bread and frankfurter matrices with an optimized liquid chromatography-tandem mass spectrometry external standard calibration workflow[J]. Journal of Food Protection, 2022, 85(2): 311-322. DOI:10.4315/JFP-21-260.
- [62] HENROTTIN J, PLANQUE M, HUET A C, et al. Gluten analysis in processed foodstuffs by a multi-allergens and grain-specific UHPLC-MS/MS method: one method to detect them all[J]. Journal of AOAC International, 2019, 102(5): 1286-1302. DOI:10.5740/jaoacint.19-0057.
- [63] SEKI Y, NAKAMURA K, ARIMOTO C, et al. Development of a simple and reliable high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry approach to simultaneously detect grains specified in food allergen labeling regulation on processed food commodities[J]. Journal of Chromatography A, 2021, 1639: 461877. DOI:10.1016/j.chroma.2021.461877.
- [64] MA X L, LI H, ZHANG J K, et al. Comprehensive quantification of sesame allergens in processed food using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Control, 2020, 107: 106744. DOI:10.1016/j.foodcont.2019.106744.
- [65] KIYOTA K, YOSHIMITSU M, UCHIDA K, et al. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of hen's egg white allergens Gal d 1-4 in fresh and processed eggs[J]. Food Chemistry, 2021, 345: 128022. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.128022.
- [66] KIYOTA K, YOSHIMITSU M, MATSUI H. Simultaneous quantitative analysis of six allergens Gal d 1-Gal d 6 from hen eggs in processed egg foods using mass spectrometry[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2024, 125: 105821. DOI:10.1016/j.jfca.2023.105821.
- [67] YANG S P, CHEN J J, ABDALLAH M F, et al. An integrated calibration strategy for the development and validation of an LC-MS/MS method for accurate quantification of egg allergens (Gal d 1-6) in foods[J]. Food Chemistry, 2024, 438: 137922. DOI:10.1016/j.foodchem.2023.137922.
- [68] 宁亚维, 刘茁, 杨正, 等. UPLC-MS/MS法同时检测食品中3种主要牛奶过敏原[J]. 食品科学, 2021, 42(8): 270-276. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200419-248.
- [69] NELIS J L D, DAWSON A L, BOSE U, et al. Safe food through better labelling: a robust method for the rapid determination of caprine and bovine milk allergens[J]. Food Chemistry, 2023, 417: 135885. DOI:10.1016/j.foodchem.2023.135885.
- [70] RAMACHANDRAN B, YANG C T, DOWNS M L. Parallel reaction monitoring mass spectrometry method for detection of both casein and whey milk allergens from a baked food matrix[J]. Journal of Proteome Research, 2020, 19(8): 2964-2976. DOI:10.1021/acs.jproteome.9b00844.
- [71] RAMACHANDRAN B, DOWNS M L. Development and validation of a targeted mass spectrometry method for the quantification of milk protein allergens in multiple complex food matrices using matrix-independent calibration[J]. Food Control, 2024, 162: 110444. DOI:10.1016/j.foodcont.2024.110444.
- [72] 刘彤彤, 梁瑞强, 韩伟娜, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定肉制品中的虾过敏原[J]. 食品工业科技, 2023, 44(6): 292-299. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2022050152.
- [73] WANG J H, GE M M, SUN L R, et al. Quantification of crustacean tropomyosin in foods using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, 101(12): 5278-5285. DOI:10.1002/jsfa.11177.
- [74] LI H, LI T S, WANG Y B, et al. Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for comprehensive quantification of crustacean tropomyosin and arginine kinase in food matrix[J]. Food Control, 2022, 140: 109137. DOI:10.1016/j.foodcont.2022.109137.

- [75] 孟佳, 古淑青, 方真, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定肉制品和调味料中7种水产品过敏原[J]. 色谱, 2019, 37(7): 712-722. DOI:10.3724/SP.J.1123.2019.01042.
- [76] SUN L R, LIN H, LI Z X, et al. Development of a method for the quantification of fish major allergen parvalbumin in food matrix via liquid chromatography-tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring[J]. Food Chemistry, 2019, 276: 358-365. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.10.014.
- [77] PILOLLI R, DE ANGELIS E, MONACI L. In house validation of a high resolution mass spectrometry Orbitrap-based method for multiple allergen detection in a processed model food[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2018, 410(22): 5653-5662. DOI:10.1007/s00216-018-0927-8.
- [78] HENROTTIN J, PILOLLI R, HUET A C, et al. Optimization of a sample preparation workflow based on UHPLC-MS/MS method for multi-allergen detection in chocolate: an outcome of the ThRAII project[J]. Food Control, 2023, 143: 109256. DOI:10.1016/j.foodcont.2022.109256.
- [79] PILOLLI R, LAMONACA A, NITRIDE C, et al. In-house validation of an LC-MS method for the multiplexed quantitative determination of total allergenic food in chocolate[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2024, 416(3): 809-825. DOI:10.1007/s00216-023-04894-2.
- [80] MONTOWSKA M, FORMAL E, PIĄTEK M, et al. Mass spectrometry detection of protein allergenic additives in emulsion-type pork sausages[J]. Food Control, 2019, 104: 122-131. DOI:10.1016/j.foodcont.2019.04.022.
- [81] STELLA R, SETTE G, MORESSA A, et al. LC-HRMS/MS for the simultaneous determination of four allergens in fish and swine food products[J]. Food Chemistry, 2020, 331: 127276. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.127276.
- [82] HUANG X, ZHU Z T, FENG H, et al. Simultaneous determination of multi-allergens in surimi products by LC-MS/MS with a stable isotope-labeled peptide[J]. Food Chemistry, 2020, 320: 126580. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.126580.
- [83] BOO C C, PARKER C H, JACKSON L S. A targeted LC-MS/MS method for the simultaneous detection and quantitation of egg, milk, and peanut allergens in sugar cookies[J]. Journal of AOAC International, 2018, 101(1): 108-117. DOI:10.5740/jaoacint.17-0400.
- [84] ASHER NEWSOME G, SCHOLL P F. Quantification of allergenic bovine milk α_{s1} -casein in baked goods using an intact ^{15}N -labeled protein internal standard[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(24): 5659-5668. DOI:10.1021/jf3015238.
- [85] GAVAGE M, VAN VLIERBERGHE K, VAN POUCKE C, et al. Comparative study of concatemer efficiency as an isotope-labelled internal standard for allergen quantification[J]. Food Chemistry, 2020, 332: 127413. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.127413.
- [86] PLANQUE M, ARNOULD T, DELAHAUT P, et al. Development of a strategy for the quantification of food allergens in several food products by mass spectrometry in a routine laboratory[J]. Food Chemistry, 2019, 274: 35-45. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.08.095.
- [87] YAO K, YANG Y J, LIU J Y, et al. Labeled peptide-free UHPLC-MS/MS method used for simultaneous determination of shrimp and soybean in sauce products[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(25): 7149-7157. DOI:10.1021/acs.jafc.1c02008.
- [88] GAVAGE M, VAN VLIERBERGHE K, DIEU M, et al. Development and validation of a quantitative method for multiple allergen detection in food using concatemer-based isotope dilution mass spectrometry[J]. Journal of AOAC International, 2022, 105(6): 1585-1595. DOI:10.1093/jaoacint/qsac053.
- [89] CROOTE D, BRASLAVSKY I, QUAKE S R. Addressing complex matrix interference improves multiplex food allergen detection by targeted LC-MS/MS[J]. Analytical Chemistry, 2019, 91(15): 9760-9769. DOI:10.1021/acs.analchem.9b01388.
- [90] MARZANO V, TILOCCA B, FIOCCHI A G, et al. Perusal of food allergens analysis by mass spectrometry-based proteomics[J]. Journal of Proteomics, 2020, 215: 103636. DOI:10.1016/j.jprot.2020.103636.
- [91] HUET A C, PAULUS M, HENROTTIN J, et al. Development of incurred chocolate bars and broth powder with six fully characterised food allergens as test materials for food allergen analysis[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2022, 414(8): 2553-2570. DOI:10.1007/s00216-022-03912-z.
- [92] PILOLLI R, VAN POUCKE C, DE ANGELIS E, et al. Discovery based high resolution MS/MS analysis for selection of allergen markers in chocolate and broth powder matrices[J]. Food Chemistry, 2021, 343: 128533. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.128533.
- [93] 宁亚维, 杨正, 马梦戈, 等. 食品中常见过敏原及检测技术研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(15): 319-328. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200614-191.
- [94] 邢玉飞, 布冠好, 陈复生, 等. 大豆主要致敏蛋白及其检测技术研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(15): 261-268. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220826-316.
- [95] 李丽芳, 黄文胜, 张九凯, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测大豆主要过敏原蛋白[J]. 食品科学, 2020, 41(24): 316-324. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190923-278.
- [96] ATASOY G, ULUTAS B, TURHAN M. Potential ways for gluten contamination of gluten-free grain and gluten-free foods: the buckwheat case[J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2020, 37(10): 1591-1600. DOI:10.1080/19440049.2020.1787529.
- [97] ZENG J H, MA F F, ZHAI L G, et al. Recent advance in sesame allergens: influence of food processing and their detection methods[J]. Food Chemistry, 2024, 448: 139058. DOI:10.1016/j.foodchem.2024.139058.
- [98] OGURA T, CLIFFORD R, OPPERMANN U. Simultaneous detection of 13 allergens in thermally processed food using targeted LC-MS/MS approach[J]. Journal of AOAC International, 2019, 102(5): 1316-1329. DOI:10.5740/jaoacint.19-0060.
- [99] DOWNS M L, MCCLURE B A, JAYASENA S, et al. Development and interlaboratory evaluation of an LC-MS/MS method for the quantification of lysozyme in wine across independent instrument platforms[J]. Journal of AOAC International, 2022, 105(2): 433-441. DOI:10.1093/jaoacint/qsab120.
- [100] PAEZ V, BARRETT W B, DENG X J, et al. AOAC SMPR® 2016.002[J]. Journal of AOAC International, 2016, 99(4): 1122-1124. DOI:10.5740/jaoacint.smp2016.002.
- [101] GAVAGE M, VAN VLIERBERGHE K, VAN POUCKE C, et al. Selection of egg peptide biomarkers in processed food products by high resolution mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2019, 1584: 115-125. DOI:10.1016/j.chroma.2018.11.036.
- [102] GAVAGE M, VAN VLIERBERGHE K, DIEU M, et al. Multi-allergen quantification in food using concatemer-based isotope dilution mass spectrometry: an interlaboratory study[J]. Journal of AOAC International, 2023, 106(4): 886-898. DOI:10.1093/jaoacint/qsad041.
- [103] XIONG W L, PARKER C H, BOO C C, et al. Comparison of allergen quantification strategies for egg, milk, and peanut in food using targeted LC-MS/MS[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2021, 413(23): 5755-5766. DOI:10.1007/s00216-021-03550-x.

- [104] PLANQUE M, ARNOULD T, RENARD P, et al. Highlight on bottlenecks in food allergen analysis: detection and quantification by mass spectrometry[J]. Journal of AOAC International, 2017, 100(4): 1126-1130. DOI:10.5740/jaoacint.17-0005.
- [105] RAJKOVIC A, JOVANOVIĆ J, MONTEIRO S, et al. Detection of toxins involved in foodborne diseases caused by Gram-positive bacteria[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2020, 19(4): 1605-1657. DOI:10.1111/1541-4337.12571.
- [106] LI Q, DOU L N, ZHANG Y J, et al. A comprehensive review on the detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in food samples[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2024, 23(1): e13264. DOI:10.1111/1541-4337.13264.
- [107] MASQUELIER J, SEGERS C, JACOBS B, et al. Validation of a targeted LC-MS/MS method for cereulide and application in food and faeces[J]. Toxins, 2023, 16(1): 13. DOI:10.3390/toxins16010013.
- [108] KOIKE H, KANDA M, HAYASHI H, et al. Development of an alternative approach for detecting botulinum neurotoxin type A in honey: analysis of non-toxic peptides with a reference labelled protein via liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2020, 37(8): 1359-1373. DOI:10.1080/19440049.2020.1766121.
- [109] DURACOVA M, KLIMENTOVA J, MYSLIVCOVA FUCIKOVA A, et al. Targeted mass spectrometry analysis of *Clostridium perfringens* toxins[J]. Toxins, 2019, 11(3): 177. DOI:10.3390/toxins11030177.
- [110] KOIKE H, KANDA M, HAYASHI H, et al. Quantification of staphylococcal enterotoxin type A in cow milk by using a stable isotope-labelled peptide via liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2019, 36(7): 1098-1108. DOI:10.1080/19440049.2019.1615641.
- [111] LEFEBVRE D, BLANCO-VALLE K, FERAUDET-TARISSE C, et al. Quantitative determination of *Staphylococcus aureus* enterotoxins types A to I and variants in dairy food products by multiplex immuno-LC-MS/MS[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(8): 2603-2610. DOI:10.1021/acs.jafc.0c07545.
- [112] CHENAU J, FENAILLE F, EZAN E, et al. Sensitive detection of *Bacillus anthracis* spores by immunocapture and liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(22): 8675-8682. DOI:10.1021/ac2020992.
- [113] CHENAU J, FENAILLE F, SIMON S, et al. Detection of *Yersinia pestis* in environmental and food samples by intact cell immunocapture and liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2014, 86(12): 6144-6152. DOI:10.1021/ac501371r.
- [114] CHEN C T, YU J W, HO Y P. Identification of bacteria in juice/lettuce using magnetic nanoparticles and selected reaction monitoring mass spectrometry[J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2019, 27(2): 575-584. DOI:10.1016/j.jfda.2018.09.006.
- [115] ZHAO H, WANG Y Y, ZHAO L J, et al. Evaluation and verification of the characteristic peptides for detection of *Staphylococcus aureus* in food by targeted LC-MS/MS[J]. Talanta, 2021, 235: 122794. DOI:10.1016/j.talanta.2021.122794.
- [116] GRENGA L, PIBLE O, ARMENGAUD J. Pathogen proteotyping: a rapidly developing application of mass spectrometry to address clinical concerns[J]. Clinical Mass Spectrometry, 2019, 14: 9-17. DOI:10.1016/j.clinms.2019.04.004.
- [117] WANG H H, DRAKE S K, YONG C, et al. A novel peptidomic approach to strain typing of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates using mass spectrometry[J]. Clinical Chemistry, 2016, 62(6): 866-875. DOI:10.1373/clinchem.2015.253468.
- [118] KONDORI N, KURTOVIC A, PIÑEIRO-IGLESIAS B, et al. Mass spectrometry proteotyping-based detection and identification of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Candida albicans* in blood[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2021, 11: 634215. DOI:10.3389/fcimb.2021.634215.
- [119] CHARRETIER Y, DAUWALDER O, FRANCESCHI C, et al. Rapid bacterial identification, resistance, virulence and type profiling using selected reaction monitoring mass spectrometry[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 13944. DOI:10.1038/srep13944.
- [120] KARLSSON R, THORSELL A, GOMILA M, et al. Discovery of species-unique peptide biomarkers of bacterial pathogens by tandem mass spectrometry-based proteotyping[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2020, 19(3): 518-528. DOI:10.1074/mcp.RA119.001667.
- [121] WANG H H, DRAKE S K, YONG C, et al. A genoproteomic approach to detect peptide markers of bacterial respiratory pathogens[J]. Clinical Chemistry, 2017, 63(8): 1398-1408. DOI:10.1373/clinchem.2016.269647.
- [122] BARDET C, BARRAUD O, CLAVEL M, et al. Early and specific targeted mass spectrometry-based identification of bacteria in endotracheal aspirates of patients suspected with ventilator-associated pneumonia[J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2021, 40(6): 1291-1301. DOI:10.1007/s10096-020-04132-y.
- [123] CHEN S H, PARKER C H, CROLEY T R, et al. Identification of *Salmonella taxon*-specific peptide markers to the serovar level by mass spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2019, 91(7): 4388-4395. DOI:10.1021/acs.analchem.8b04843.
- [124] ABRIL A G, CALO-MATA P, BÖHME K, et al. Shotgun proteomic analyses of *Pseudomonas* species isolated from fish products[J]. Food Chemistry, 2024, 450: 139342. DOI:10.1016/j.foodchem.2024.139342.
- [125] ABRIL A G, CALO-MATA P, VILLA T G, et al. Comprehensive shotgun proteomic characterization and virulence factors of seafood spoilage bacteria[J]. Food Chemistry, 2024, 448: 139045. DOI:10.1016/j.foodchem.2024.139045.
- [126] ABRIL A G, CALO-MATA P, BÖHME K, et al. Shotgun proteomics analysis, functional networks, and peptide biomarkers for seafood-originating biogenic-amine-producing bacteria[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(9): 7704. DOI:10.3390/ijms24097704.