

# 基于液相色谱-质谱联用技术检测食物过敏原研究进展

熊丽姬<sup>1,2</sup>, 佟平<sup>1</sup>, 肖娜<sup>1,3</sup>, 陈红兵<sup>1,3,\*</sup>

(1.南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047;

2.南昌大学环境与化学工程学院, 江西 南昌 330047; 3.南昌大学中德联合研究院, 江西 南昌 330047)

**摘要:** 食物过敏是目前重要的食品安全问题, 检测食物过敏原对保护过敏患者具有重要意义。检测食物基质中痕量的过敏成分依赖于可靠的分析方法。液相色谱-质谱联用技术具有高灵敏性、高分辨率、高自动化等特点, 被广泛应用于食物过敏原蛋白质的研究中。本文主要阐述了液相色谱-质谱联用技术在单一过敏食物中过敏原蛋白质的检测方面和在复杂基质中多个食物过敏原蛋白质的检测方面的应用, 并简要概述了提高液相色谱-质谱联用技术检测过敏原蛋白精准确度的措施, 指出液相色谱-质谱联用技术在检测食物过敏原方面还需要继续深入研究。

**关键词:** 液相色谱-质谱联用; 食物过敏原; 检测

Progress in Detection of Food Allergens Based on Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry

XIONG Li-ji<sup>1,2</sup>, TONG Ping<sup>1</sup>, XIAO Na<sup>1,3</sup>, CHEN Hong-bing<sup>1,3,\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

2. School of Environment and Chemical Engineering, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

3. Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract:** Food allergy is currently an important problem in food safety, and the detection of food allergens is of great significance for protecting allergic consumers. The detection of trace allergenic proteins in a complex food matrix mainly relies on a reliable analysis method. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) with the advantages of high throughput, high resolution and high automation is widely used to explore food allergen proteins. This article reviews the application of LC-MS for detecting allergens in a single or complicated food matrix, and suggests ways to improve the accuracy of LC-MS. However, further studies are necessary for the detection of allergens in food matrices by LC-MS.

**Key words:** liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS); food allergen; detection

中图分类号: TS201.6

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 21-0274-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201421054

食物过敏是过敏患者对某些食物蛋白质产生的一种不良免疫反应<sup>[1]</sup>, 在发达国家影响着约1%的成人<sup>[2]</sup>和4%的婴幼儿<sup>[3]</sup>, 是食品安全中的主要问题之一。引起人体食物过敏的抗原物质称为过敏原。过敏原组网站报道了2 294种物种中的4 248种过敏原, 其中, 鸡蛋、牛奶、小麦、花生、大豆、坚果、鱼类和贝类是易引起食物过敏的八大类食物, 同时也是食品工业中的重要原材料。食物过敏的症状包括荨麻疹、呕吐和哮喘等, 严重时甚至会威胁生命<sup>[4]</sup>, 避免食用含有过敏原的食物是目前唯一

有效的预防方法。详尽的食物标签可为消费者成功避免过敏原提供关键信息。欧洲在2003和2007年两次修改食物过敏原标签法案, 两个法案都强制要求食品制造商标示出食品原材料中的13种潜在过敏原, 包括八大类食物过敏原以及芹菜、芥末、芝麻、羽扇豆和软体动物过敏原<sup>[5]</sup>。食物在生产、贮存和加工过程中可能发生交叉污染, 食品制造商常以“可能含有”或者“在加工过程中产生”标示于包装上。澳大利亚、新西兰、加拿大、日本和美国也强制要求在标签上标示食物过敏原<sup>[6]</sup>。

收稿日期: 2014-06-27

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2013AA102205); 国家国际科技合作专项(2013DFG31380);

国家自然科学基金面上项目(31171716); 国家自然科学基金青年科学基金项目(31301524);

2011年度高等学校博士学科点专项科研基金项目(20113601110003); 江西省自然科学基金重点项目(20133ACB2009);

南昌大学食品科学与技术国家重点实验室项目(SKLF-ZZA-201302; SKLF-ZZB-201302)

作者简介: 熊丽姬(1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物化工。E-mail: zedeck@163.com

\*通信作者: 陈红兵(1967—), 男, 教授, 硕士, 研究方向为食品营养与安全。E-mail: chbgjy@hotmail.com

工业化的食品生产流水线可能会使食物污染过敏原,建立检测这些“隐藏过敏原”的分析方法具有重要意义。故迫切需要建立强大的检测食品中过敏原的方法,以期食物过敏患者提供信息更全面的标签,提高食物过敏患者的食用安全性。目前检测食物过敏原常用的分析方法包括放射变应性吸附法(radioallergosorbent, RAST)、免疫印迹(immunoblotting)、酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)和液相色谱-质谱联用(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)等,其中RAST、免疫印迹、ELISA法是基于蛋白质的免疫学方法,PCR是基于DNA的分子生物学方法,LC-MS是非免疫法。ELISA法能检测0.1~10 mg/kg基质,结果存在假阴性和假阳性,影响着检测的准确性,但有多种市售的ELISA试剂盒供选择,是目前食品工业和官方食品机构最常用的方法。PCR法检测食物过敏原时,取决于过敏原蛋白的浓度、物种、生长条件和DNA水平,不能直接检测食物过敏原,限制了其在检测食物过敏原中的应用<sup>[7]</sup>。另外,ELISA和PCR均不能区分过敏原的物种和品种。液相色谱-质谱联用(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)是唯一鉴定食物中过敏原蛋白的非免疫技术,具有更快速、更灵敏和更准确等特点,是检测蛋白质的核心技术<sup>[8]</sup>。目前已经有很多国外专家从不同角度综述了液相色谱-质谱联用在检测食物过敏原上的应用,同时美国分析化学家协会(association of official analytical chemists, AOAC)在2011年的国际研讨会上也把食物过敏原的检测作为会议重点<sup>[9]</sup>。本文简要综述了液质联用技术检测单一食物及复杂基质中的多个食物过敏原中的应用。

## 1 液相色谱-质谱联用的原理

液相色谱-质谱联用技术始于20世纪70年代,主要用于药物和环境分析等领域。20世纪90年代,质谱技术的改进使蛋白质组学发生了革命性的变化,随着离子化技术的发展,电喷雾(electrospray ionization, ESI)和基质辅助激光解析(matrix assisted laser desorption ionization, MADLI)两种软电离方式的出现,使液相色谱-质谱联用技术在蛋白质组研究中发挥越来越重要的作用<sup>[10]</sup>。在食品工业领域,利用液相色谱-质谱联用技术检测食品中的过敏原蛋白质,有利于在标签上准确标识食品中的过敏成分<sup>[11]</sup>。

液相色谱-质谱联用主要包含两个部分,即液相色谱和质谱。液相色谱是利用蛋白质分子与固定相相互作用的强弱进行分离,其中高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)目前应用最广泛<sup>[12]</sup>。质谱是将样品分子离子化后,根据不同离子间的质荷比( $m/z$ )的差异进

行分离,经质量分析器和检测器检测形成质谱图,确定样品的分子质量。质量分析器主要包括以下几种类型:飞行时间(time of flight, TOF)、四极杆(quadrupole, Q)、离子阱(ion trap, IT)、傅里叶变换回旋共振(fourier transform ion cyclotron resonance, FT-ICR)和静电场轨道阱(orbitrap)等。通常将质量分析器进行联用,如三级四极杆质谱(TQ)、四极杆-离子阱质谱(QIT)、四极杆飞行时间质谱(Q-TOF)、离子阱飞行时间质谱(IT-TOF)、线性离子阱静电场轨道阱质谱(LTQ-orbitrap)和线性离子阱傅里叶变化离子回旋共振质谱(LTQ-FTICR)等。液相色谱-质谱联用具有高灵敏度、高分辨率、高自动化等特点,被广泛应用于食物过敏原蛋白质的研究中,但专业质谱设备成本较高,限制了其在食品工业中的广泛应用。

## 2 液相色谱-质谱联用在食物过敏原蛋白检测中的应用

食物过敏原主要是在特定食品中含有的、天然存在的,通常相对分子质量介于10 000~70 000之间的蛋白质或糖蛋白<sup>[13]</sup>。过敏原蛋白一般具有酸性等电点,无生物化学和免疫化学的共性,也无统一的氨基酸序列,常具有耐热、耐酸、耐酶解等特性,但果蔬主要过敏原除外<sup>[14]</sup>。

### 2.1 单一过敏食物中过敏原蛋白质的检测

研究者们对食物中的过敏原的检测开展了一系列的研究。 $\beta$ -酪蛋白是牛奶中的一种主要过敏原蛋白质,Benedé等<sup>[15]</sup>利用多肽微矩阵芯片法,鉴定出了 $\beta$ -酪蛋白与人血清IgE结合能力最强的肽段为AA57~93区域, $\beta$ -酪蛋白经过模拟胃肠消化后,利用RP-HPLC-MS-MS鉴定出了消化后样品的152个多肽片段,研究发现 $\beta$ -酪蛋白消化后仍存在与人血清IgE结合能力较强的肽段AA57~68和AA82~93。食物过敏原蛋白质被酶解后能产生多种功能性多肽,鉴别和定量功能性多肽对于功能性食品的研发具有重要意义。牛奶作为生物活性多肽的重要来源,被广泛研究,Holder等<sup>[16]</sup>建立了LC-ESI-MS-MS法分析检测酪蛋白源和 $\beta$ -酪蛋白源的活性多肽,总共定量出11个生物活性多肽,该方法能应用于各种样品,包括水解产物、超滤后的渗透物和滞留物组分的检测,这是首次建立的定量功能性乳制品多肽的参考方法。

大豆等其他食物的多肽同样具有众多生物活性,如血管紧张肽I型转酶抑制性<sup>[17]</sup>、抗氧化性<sup>[18]</sup>、抗癌性和降血压等,适用于营养保健食品的研发<sup>[19]</sup>,常应用液相色谱-质谱联用对其过敏原进行分析。榛子在焙烤后压碎或研磨成糊状,可作果仁糖和巧克力产品的原材料,定量榛子中的主要过敏原蛋白有利于食品加工行业的安全。Rigby等<sup>[20]</sup>应用LC-ESI-MS和MALDI-TOF-MS鉴定出榛子中的3种主要过敏原蛋白为脂质转移蛋白(lipid

transfer protein, LTPs)、7S球蛋白(Cor a 11)和11S球蛋白(Cor a 9)。2S白蛋白是很多植物性食物的主要过敏原,在巴西坚果中含量丰富,其高特异性加大了鉴定的困难。Moreno等<sup>[21]</sup>运用RP-HPLC-ESI-MS成功从巴西坚果中鉴定出2S白蛋白中最主要的两种亚型,该方法能有效应用于其他蛋白质家族的亚型的鉴定,对未来研究突变、翻译后修饰过敏原蛋白特性至关重要。玉米中的LTPs蛋白也是一种主要过敏原,在食品加工和蛋白酶解过程中极度稳定,由于分子非均质性和稳定性,使得鉴定LTPs成为一个巨大挑战。Kuppanan等<sup>[22]</sup>运用LC-UV-MS第一次鉴定出玉米粒的LTPs蛋白质中的3个亚型。Chassaingne等<sup>[23]</sup>建立了毛细管液相色谱和nano-ESI-Q-TOF-MS-MS联用法,鉴定出生花生和烤花生中一组高度稳定的花生过敏原特异性肽段,用于鉴别Ara h 1和Ara h 3/4的不同亚型。综上所述,液相色谱-质谱联用技术可广泛应用于鉴定天然的和加工后的食物中的过敏原蛋白质及其不同亚型。

## 2.2 复杂基质中多个食物过敏原蛋白质的检测

多个过敏原在食品基质中的检测与定量是亟待解决的关键问题。在欧洲和美国,食物过敏的发病率越来越高,但是目前尚未建立过敏原对过敏患者造成最小损害的最低阈值<sup>[2]</sup>。

在高度加工食品中,过敏反应能在低浓度蛋白质水平上发生,故需要建立选择性强和灵敏度高的方法来检测痕量水平上(过敏原1~10 mg/kg基质)食物过敏原的存在。Monaci等<sup>[24]</sup>采用固相萃取和液相色谱-质谱联用法,建立了检测饮料中牛奶过敏原蛋白质的方法,他们从市售的15种混合果汁中鉴定出痕量的3种牛奶蛋白质乳白蛋白、乳球蛋白A和B,检测限低至1 μg/mL,能协助保护牛奶过敏患者的健康。Azarnia等<sup>[25]</sup>则利用LC-ESI-MS和ELISA试剂盒两种方法分别检测出蛋清、全蛋和用含有蛋清或全蛋的面团制成的意大利面条中的卵白蛋白,运用LC-ESI-MS成功识别出用于检测鸡蛋过敏原存在的4个特异性肽段:GGLEPINFQTAADQAR、LTEWTSSNVMEER、VTEQESKPVQMMYQIGLFR和EVVGSAGVDAASVSEFR,但两种方法均不能用于检测烹调后意大利面中的卵白蛋白,说明复杂基质和加工方式会影响面条中鸡蛋过敏原的检测。

为避免食物基质和加工过程的多样性对检测过敏原蛋白质的影响,选择稳定的特异性肽段十分重要,这对于安全评估新资源食品中潜在过敏原也具有重要价值<sup>[26]</sup>。特异性肽段是长度介于10~20个氨基酸之间<sup>[27]</sup>的肽段,其选择有特殊的标准。特异性肽段对目标蛋白具有专一性,且在质谱检测中浓度较低时也能与其他肽段区分<sup>[28]</sup>。Carrera等<sup>[29]</sup>利用液相色谱-质谱联用建立了一种快速检测鱼类主要过敏原β-小清蛋白的方法,利用筛选到的19个

特异性肽段,可以快速识别出不同食物中的β-小清蛋白。Houston等<sup>[30]</sup>在大豆10个过敏原中,每个过敏原识别出2个特异性肽段,但由于特异性肽段的选择标准<sup>[26]</sup>,只有15个肽段为理想特异性肽段。

在白葡萄酒制作中,牛奶、鸡蛋和海鲜中的蛋白质常用于葡萄酒的澄清,在葡萄酒中的残留对过敏消费者存在巨大危害,多个国家已经要求在标签上标示过敏原信息。Losito等<sup>[31]</sup>运用LC-ESI-3D IT-MS定量分析白葡萄酒澄清过程中酪蛋白酸钠(β-、α<sub>s1</sub>-和α<sub>s2</sub>-酪蛋白)的潜在残留,结果鉴定出酪蛋白酸钠的4个特异性肽段,肽段GPFPIIV属于β-酪蛋白,FFVAPPEVFGK和YLGYLEQLLR属于α<sub>s1</sub>-酪蛋白,ENLC(c)-STFC(c)K属于α<sub>s2</sub>-酪蛋白,其中β-酪蛋白中的肽段GPFPIIV的质谱信号与酪蛋白酸钠的浓度线性相关,是定量酪蛋白酸钠的最佳特异性肽段。

Shefcheck等<sup>[32]</sup>运用LC-ESI-MS-MS和多反应检测器识别出Ara h 1的两个特异性肽段,可用于检测黑巧克力中花生过敏原蛋白质Ara h 1,将花生过敏原Ara h 1的最低检测限提高至2×10<sup>-6</sup> mg/mg,该方法可用于检测其他食物基质和过敏蛋白质,为开发检测基质中蛋白质的新型方法提供契机。Pedreschi等<sup>[33]</sup>以商业化的花生测试样品IRMM-481(包含5种不同种类和不同焙烤处理的花生的混合)为参考材料,在制作饼干时加入不同浓度的IRMM-481(0、10、100、1 000、10 000 μg/g食物基质),利用nano UPLC-ESI Q-TOF-MS-MS识别出Ara h 3/4的两个特异性肽段AHVQVVDNSNGNR和SPDIYNPQAGSLK,可应用于检测焙烤饼干中痕量水平上(≥10 μg/g基质)的花生。

Heick等<sup>[34]</sup>在食物过敏原含量为10~1 000 μg/g的基质中,利用LC-MS识别出了特异性肽段YIPILPEYLQCVK(鸡蛋)、QCCQQLSQMDEQCQCEGLR(核桃仁)、YLGYLEQLLR(牛奶)、VFDGELQEGR(大豆)、INTVNSNTLPVLR(榛子)、DLAFPGSGEQVEK(花生)、DLPNECGISSQR(核桃仁)和GNLDFVPPR(扁桃仁),其中,牛奶、核桃仁、花生和扁桃仁的最低检测限均为10 μg/g基质,鸡蛋和大豆的最低检测限为50 μg/g基质,核桃仁为70 μg/g基质,这是第一次利用LC-MS同时检测同一种食品中的7种过敏原,且具有较低检测限。以上研究表明,液相色谱-质谱联用检测特定的食物过敏原具有优越性。然而,选择特异性肽段作为标准和参考物质还需要进一步的评估。

一些研究者将基于ELISA的免疫法和基于DNA的PCR法与液相色谱-质谱联用法一起进行比较。Lee等<sup>[35]</sup>比较了3种方法检测6种以鸡蛋为原料的食物(生鸡蛋、煮鹌鹑蛋、鸡蛋饼干、蛋黄酱、波拉克干汤和冰淇淋)和5种不含鸡蛋的食物样品(牛奶、橘子汁、饼干、鸡肉和

烤鸭)中的鸡蛋过敏原。研究发现基于ELISA的免疫法能特异性地检测出加工食物中微量的鸡蛋过敏原,但卵类黏蛋白由于在尿素下不能变性并且耐胰蛋白酶消化,不能被基于LC-Q-TOF-MS-MS的方法所检测;鸡蛋和鸡肉由于其组织的非特异性,不能被基于DNA的PCR法区分。Heick等<sup>[36]</sup>以面包作为模型基质,制作含有牛奶、鸡蛋、大豆、榛子、花生、核桃仁、扁桃仁7种过敏食物的面包,运用LC-MS法和ELISA试剂盒分别同时检测面包焙烤前后的7种过敏原食物,研究发现两种方法均能检测出焙烤前后花生、榛子、核桃仁和扁桃仁的存在,LC-MS法还能检出牛奶、鸡蛋和黄豆,比ELISA法具有更优越的检测能力。Weber等<sup>[37]</sup>建立了离子交换色谱和浓缩离心设备对样品进行预处理的方法,运用LC-MS-MS和ELISA分析研究6种市售食物基质(巧克力、饼干、婴儿食品、冷冻甜点、香肠和肉中酪蛋白)的存在,利用LC-MS-MS识别出 $\alpha_{s1}$ -酪蛋白的两个特异性肽段,可用于筛选基质中酪蛋白的存在,同时发现两种方法的结果具有一致性。液相色谱-质谱联用法也可用于检测食物中牛奶的其他过敏原蛋白质,且可与其他检测分析的结果相互佐证。综上所述,ELISA和PCR法常用于餐饮和食品工业的过敏原的常规筛查,而质谱法则较多应用于研究领域。

### 3 提高过敏原蛋白质检测精确度的措施

新型质谱仪的问世,能有效弥补质谱在检测食物过敏原的一些不足,如基质效应较高、样品储存过短等。电感耦合等离子体质谱(inductively coupled plasma-mass spectrometry, ICP-MS)是一种新型的质谱,具有较低的基质效应和检测限、优良的响应线性度、样品的长期贮存和不同的元素标签检测多种分析物的能力等优点,最近也被应用于过敏原蛋白质的检测与定量中。Careri等<sup>[38]</sup>应用基于ICP-MS的ELISA免疫法定量检测谷物基质食物中隐藏的花生过敏原Ara h 1和Ara h 3/4,能检测低至2 mg/kg的谷物基质。Careri等<sup>[39]</sup>以铋标记的ICP-MS免疫法和液相色谱-电喷雾电离串联质谱分析两种方法鉴定巧克力脆米花为基质中的花生过敏原,LC-MS-MS鉴定出花生蛋白质Ara h 2和Ara h 3/4的4种特异性肽段,检测限分别为1  $\mu\text{g/g}$ 基质和5  $\mu\text{g/g}$ 基质;而间接ELISA-ICP-MS法为2.2  $\mu\text{g/g}$ 基质和5  $\mu\text{g/g}$ 基质。两种方法并行分析策略能有效提高检测和定量食物基质中过敏原蛋白的精确性。

复杂的食物基质对检测结果的影响巨大,对样品进行不同的预提取处理,可以提高结果的准确性,降低复杂基质对食物过敏原蛋白检测的影响。Careri等<sup>[40]</sup>建立了一种新的提取蛋白质的方法——免疫磁珠法,用于提取早餐谷物中的花生过敏原蛋白Ara h 3/4。包被特异性

抗体的免疫磁珠,能有效地从早餐谷物中选择性地提取Ara h 3/4,降低基质的影响。在子离子和选择反应监测两种模式下,利用LC-ESI-IT-MS-MS识别出早餐谷物中微量花生过敏原Ara h 3/4两个特异性肽段,检测限为3  $\mu\text{g/g}$ 基质。综上,在复杂基质中检测和定量食物过敏原,选择合适的样品预处理方法,能克服基质的干扰,提高结果的精确性。

### 4 结语

食物过敏原的检测是食品安全领域的一个难题。液相色谱-质谱联用法是分析食物过敏原的强大工具,能检测过敏原蛋白质的存在、亚型、特异性肽段等,且在检测复杂基质中的多个过敏原蛋白质具有优越性,为相关的食品行业和监管机构安全评估食物过敏原和食物过敏的正确标签提供支持。新型质谱的问世、样品预提取处理以及ELISA免疫法和液相色谱-质谱联用非免疫法进行联用等措施,能使结果更准确,且能提高食物加工链的安全性。目前液相色谱-质谱联用法在检测牛奶过敏原酪蛋白和花生过敏原中取得较大成就,但对其他食物过敏原蛋白质的研究相对较少。液相色谱-质谱联用在检测食物过敏原修饰包括氨基酸修饰、遗传变异、脱酰胺基、氧化、糖基化、磷酸化和硫酸化等中也具有巨大潜力,但专业质谱设备成本较高,限制了其在食品工业中的广泛应用。此外,液相色谱-质谱联用检测食物过敏原时的特异性、选择性和可靠性等特性仍需继续深入研究。

### 参考文献:

- [1] WAISARAYUTT C, SUROJANAMETAKUL V, KAEWPRADUB S K, et al. Investigation on the understanding and implementation of food allergen management among Thai food manufacturers[J]. Food Control, 2014, 46: 182-188.
- [2] ALINE R A, ADRIANO G C, JOSE A F J, et al. Food allergens: knowledge and practices of food handlers in restaurants[J]. Food Control, 2010, 21(10): 1318-1321.
- [3] CARINA V, BRETT P, JANE G, et al. Incidence of parentally reported and clinically diagnosed food hypersensitivity in the first year of life[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2006, 117(5): 1118-1124.
- [4] HUGH A. Anaphylaxis and emergency treatment[J]. Pediatrics, 2003, 111(3): 1601-1608.
- [5] The Commission of The European Communities. Commission Directive 2007/68/EC of November 2007 Amending Annex IIIa to Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council as Regards Certain Food Ingredients[S]. European Union: Official Journal of the European Union, 2007.
- [6] ALLEN K J, TURNER P J, PAWANKAR R, et al. Precautionary labeling of foods for allergen content: are we ready for a global framework?[J]. The World Allergy Organization Journal, 2014, 7: 10. doi: 10.1186/1939-4551-7-10. eCollection 2014.
- [7] ARJON J V H. Food allergen detection methods and the challenge

- to protect food-allergic consumers[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007, 389(1): 111-118.
- [8] SANCHO A I, MILLS E N C. Proteomic approaches for qualitative and quantitative characterization of food allergens[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2010, 58(Suppl 1): 42-46.
- [9] AOAC中国年会暨食品安全技术与标准国际研讨会落幕[J]. 实验与分析, 2011(6): 6.
- [10] GIANLUCA P, GIANFRANCO M, FRANCESCO A, et al. The frontiers of mass spectrometry-based techniques in food allergenomics[J]. Journal of Chromatography A, 2011, 1218(42): 7386-7398.
- [11] STEPHANIE K, SEVERINE F, ROWAN D, et al. Quantitative methods for food allergens: a review[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009, 395(1): 57-67.
- [12] MARTINA K, DEAN C, ANDREAS L L. Next generation of food allergen quantification using mass spectrometric systems[J]. Journal of Proteome Research, 2014, 13(8): 3499-3509.
- [13] SCOTT H S, HUGH A S. Food allergy[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2006, 117(Suppl 2): 470-475.
- [14] WESLEY B, RICKI H, STEVE S, et al. Food allergens[J]. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology, 2001, 1(3): 243-248.
- [15] BENEDEÉS, LPEZ-EXPÓSITO I, GIMÉNEZ G, et al. *in vitro* digestibility of bovine  $\beta$ -casein with simulated and human oral and gastrointestinal fluids. Identification and IgE-reactivity of the resultant peptides[J]. Food Chemistry, 2014, 143(15): 514-521.
- [16] HOLDER A, THIENEL K, KLAIBER I, et al. Quantification of bio- and techno-functional peptides in tryptic bovine micellar casein and  $\beta$ -casein hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2014, 158: 118-124.
- [17] PUCHALSKA P, GARCÍA M C, MARINA L M. Identification of native angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides in commercial soybean based infant formulas using HPLC-Q-TOF-MS[J]. Food Chemistry, 2014, 157: 62-69.
- [18] PUCHALSKA P, MARINA M L, GARCIA M C. Isolation and identification of antioxidant peptides from commercial soybean-based infant formulas[J]. Food Chemistry, 2014, 148(1): 147-154.
- [19] BRIJ P S, SHILPA V, SUBROTA H. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean[J]. Peptides, 2014, 54: 171-179.
- [20] RIGBY N M, MARSH J, SANCHO A I, et al. The purification and characterisation of allergenic hazelnut seed proteins[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2008, 52(Suppl 2): 251-261.
- [21] MORENO F J, JENKINS J A, MELLON F A, et al. Mass spectrometry and structural characterization of 2S albumin isoforms from Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*)[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2004, 1698(2): 175-186.
- [22] KUPPANNAN K, ALBERS D R, SCHAFER B W, et al. Quantification and characterization of maize lipid transfer protein, a food allergen, by liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection[J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(2): 516-524.
- [23] CHASSAIGNE H, NORGAARD J V, HENGEL A J. Proteomics-based approach to detect and identify major allergens in processed peanuts by capillary LC-Q-TOF (MS/MS)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(11): 4461-4473.
- [24] MONACI L, van HENGEL A J. Development of a method for the quantification of whey allergen traces in mixed-fruit juices based on liquid chromatography with mass spectrometric detection[J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1192(1): 113-120.
- [25] AZARNIA S, BOYE J I, MONGEON V, et al. Detection of ovalbumin in egg white, whole egg and incurred pasta using LC-ESI-MS-MS and ELISA[J]. Food Research International, 2013, 52(2): 526-534.
- [26] HOBSON D J, RUPA P, DIAZ G J, et al. Proteomic analysis of ovomucoid hypersensitivity in mice by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE)[J]. Food and Chemical Toxicology, 2007, 45(12): 2372-8080.
- [27] MENG Z, VEENSTRA T D. Targeted mass spectrometry approaches for protein biomarker verification[J]. Journal of Proteomics, 2011, 74(12): 2650-2659.
- [28] RAUH M. LC-MS-MS for protein and peptide quantification in clinical chemistry[J]. Journal of Chromatography B, 2012, 883/884: 59-67.
- [29] CARRERA M, CAÑAS B, GALLARDO J M. Rapid direct detection of the major fish allergen, parvalbumin, by selected MS/MS ion monitoring mass spectrometry[J]. Journal of Proteomics, 2012, 75(11): 3211-3220.
- [30] HOUSTON N L, LEE D G, STEVENSON S E, et al. Quantitation of soybean allergens using tandem mass spectrometry[J]. Journal of Proteome Research, 2011, 10(2): 763-773.
- [31] LOSITO I, INTRONA B, MONACI L, et al. Development of a method for the quantification of caseinate traces in Italian commercial white wines based on liquid chromatography-electrospray ionization-trap-mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(50): 12436-12444.
- [32] SHEFCHECK K J, CALLAHAN J H, MUSSER S M. Confirmation of peanut protein using peptide markers in dark chocolate using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(21): 7953-7959.
- [33] PEDRESCHI R, NORGAARD J, MAQUET A. Current challenges in detecting food allergens by shotgun and targeted proteomic approaches: a case study on traces of peanut allergens in baked cookies[J]. Nutrients, 2012, 4(2): 132-150.
- [34] HEICK J, FISCHER M, KERBACH S, et al. Application of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous detection of seven allergenic foods in flour and bread and comparison of the method with commercially available ELISA test kits[J]. Journal of AOAC International, 2011, 94(4): 1060-1068.
- [35] LEE J Y, KIM C J. Determination of allergenic egg proteins in food by protein-, mass spectrometry-, and DNA-based methods[J]. Journal of AOAC International, 2010, 93(2): 462-477.
- [36] HEICK J, FISCHER M, POPPING B. First screening method for the simultaneous detection of seven allergens by liquid chromatography mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2011, 1218(7): 938-943.
- [37] WEBER D, RAYMOND P, BEN-REJEB S, et al. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method using capillary liquid chromatography and nanoelectrospray ionization-quadrupole time-of-flight hybrid mass spectrometer for the detection of milk allergens[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(5): 1604-1610.
- [38] CARERI M, ELVIRI L, MANGIA A, et al. ICP-MS as a novel detection system for quantitative element-tagged immunoassay of hidden peanut allergens in foods[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007, 387(5): 1851-1854.
- [39] CARERI M, ELVIRI L, MAFFINI M, et al. Determination of peanut allergens in cereal-chocolate-based snacks: metal-tag inductively coupled plasma mass spectrometry immunoassay versus liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2008, 22(6): 807-811.
- [40] CARERI M, ELVIRI L, LAGOS J B, et al. Selective and rapid immunomagnetic bead-based sample treatment for the liquid chromatography-electrospray ion-trap mass spectrometry detection of Ara h 3/4 peanut protein in foods[J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1206(2): 89-94.