

液相色谱-串联质谱法对羊肉中鸭肉掺假的鉴别

李莹莹¹, 张颖颖¹, 丁小军², 李 静², 赵文涛¹, 陈 伟², 马燕红¹, 郭文萍¹
(1. 中国肉类食品综合研究中心, 北京 100068; 2. 赛默飞世尔科技, 上海 201206)

摘 要: 利用蛋白组学的方法研究了5种常见的食用肉中相对种属特征性多肽, 在找到的特征性多肽的基础上, 利用液相色谱-质谱联用三重四极杆质谱技术对羊肉与鸭肉混合物种特征性的多肽进行了验证与定量研究。将鸭肉按照1%、5%、10%、20%、50%比例掺加到羊肉中, 选择羊肉定量多肽5条, 鸭肉定量多肽5条, 进行定量分析, 线性相关系数为0.99以上, 检出限可以达到0.5%。研究表明, 利用液相色谱-串联质谱法构建的多肽识别技术可以快速、灵敏、准确地检测出羊肉中的鸭肉成分。

关键词: 液相色谱-串联质谱; 肉类掺假; 多肽识别; 鸭肉; 羊肉

High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method for the Detection of Adulterated Duck in Lamb

LI Yingying¹, ZHANG Yingying¹, DING Xiaojun², LI Jing², ZHAO Wentao¹, CHEN Wei², MA Yanhong¹, GUO Wenping¹
(1. China Meat Research Center, Beijing 100068, China; 2. Thermo Fisher Scientific, Shanghai 201206, China)

Abstract: Meat fraud, adulteration, and adding ingredients without labeling are all illegal behaviors, which bring potential emotional and physical damage to the consumers. In this study, a proteomic method of species-specific marker peptides of five common meats was developed. Biomarker peptides were identified, and then through qualitative analysis, species-specific peptides of lamb adulterated with duck were verified by liquid chromatography-mass spectrometry. A selective reaction monitoring (SRM) method was developed that allowed for the detection of 0.5% duck in a lamb matrix with a good linear relationship for 1%, 5%, 10%, 20% and 50% blending. The method proved to be robust, reliable, and sensitive, representing a serious alternative to methods based on biomarker peptides.

Key words: high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); meat adulteration; peptide identification; duck; lamb

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201606037

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2016) 06-0204-06

引文格式:

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.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201606037. <http://www.spkx.net.cn>

LI Yingying, ZHANG Yingying, DING Xiaojun, et al. High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the detection of duck in lamb[J]. Food Science, 2016, 37(6): 204-209. (in Chinese with English abstract)

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201606037. <http://www.spkx.net.cn>

近年来, 肉制品掺假成为全球广泛关注的食品安全问题。肉类掺假事件多次曝光, 一些不法商贩为了谋取不正当利益, 以次充好, 在国内尤其是羊肉掺假问题最为常见, 不法经营者使用相对廉价的鸭肉等低价肉类原料涂抹羊油, 冒充羊肉制品, 做成羊肉串, 羊肉卷进行销售。这种掺假行为属于商业欺诈, 扰乱了市场秩序, 同时涉及到民族饮食禁忌等问题, 严重侵犯了消费者的合法权益, 因此建立准确、高效的肉类掺假的检测方法具有重要的现实意义^[1-3]。

目前, 国内外开展肉种鉴别的方法主要包括基于抗体抗原的酶联免疫吸附 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 技术、基于核酸的聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术等, 其中实时荧光PCR方法的应用最为广泛^[4], 也是现行国家^[5]和行业标准^[6]中指定的主要方法之一。但ELISA技术容易受制于抗体的制备, 加工过程蛋白变性, 复杂基质导致假阳性^[7-8]; PCR技术

收稿日期: 2015-11-01

作者简介: 李莹莹 (1984—), 女, 高级工程师, 硕士, 研究方向为食品安全分析与检验。E-mail: ying_sky@126.com

容易受到DNA降解^[9], 复杂基质的干扰^[10]和样品提取与扩增方法的影响^[11]。

随着生物质谱技术的成熟, 大规模的定性和定量研究蛋白表达的技术已经很成熟。因此, 利用质谱技术寻找不同肉类样品特征多肽^[12-13], 并进行定量, 能够避免复杂基质干扰及假阳性判别的问题^[14-15]。近年来国外学者开展了利用多肽鉴别动物源性成分的方法研究探索, 主要针对牛肉中添加猪肉^[16]、马肉^[17]、鸡肉^[18-19]进行多肽的识别, 而对羊肉、鸭肉的多肽识别涉及很少, 多肽定量鉴别方法也没有建立。现阶段国内还没有利用该方法进行动物源性成分判别的文章发表。

本研究利用蛋白质组学生物酶切技术和质谱法多肽识别技术研究羊肉和鸭肉中的特征多肽, 建立液相色谱-串联质谱多重反应监测(selective reaction monitor, SRM)分析方法, 利用多条特征肽段母离子、子离子同时监测, 避免假阳性, 基本实现了羊肉中掺假鸭肉的量化鉴别, 该方法特异性强、灵敏度高、重复性好、具有广阔的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉、鸭肉 市购。

胰蛋白酶(测序级)、二硫苏糖醇(生化级) 美国Promega公司; 碘乙酰胺、三氟乙酸(均为生化级) 美国Sigma公司; 甲酸、乙酸、乙腈(均为色谱纯) 德国CNW科技公司; HLB固相萃取柱 美国Waters公司; 尿素、硫脲、盐酸均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

液相色谱-质谱联用高分辨系统(Easy nLC 1000液相系统和Q Exactive HF质谱平台)、液相色谱-质谱联用串联三重四极杆系统(TSQ ultra EMR液相色谱-质谱联用仪(配有电喷雾离子源及Xcalibur1.2数据处理系统)) 美国Thermo Fisher公司; 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 方法

1.3.1 样品制备

提取: 分别称取2 g肉样, 加入提取液(0.05 mol/L Tris-HCl、7 mol/L尿素、2 mol/L硫脲、pH 8.0), 冰水浴均质1 min, 再用5 mL提取液洗刀头合并, 12 000 r/min离心20 min。

还原及烷基化: 吸取100 μ L上清液, 加入10 μ L的二硫苏糖醇溶液(50 mmol/L), 56 $^{\circ}$ C振荡反应1 h。放置室温, 加入20 μ L的碘乙酰胺溶液(100 mmol/L), 暗处反应30 min。再加入15 μ L的二硫苏糖醇溶液(50 mmol/L), 暗处反应15 min^[20]。

酶切: 加入750 μ L 25 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0缓冲溶液, 加入20 μ g胰蛋白酶, 调节pH 8.0, 37 $^{\circ}$ C反应过夜^[21]。

去盐: 放置室温后, 加入0.4%三氟乙酸终止反应, 并加入1 mL水溶液准备上样。依次用乙腈、50%乙腈-水、0.1%三氟乙酸活化小柱, 上样, 再依次用0.1%三氟乙酸, 0.5%乙酸清洗, 最后用1 mL 60%乙腈+0.5%乙酸洗脱, 过0.22 μ m滤膜, 准备上机。

1.3.2 液相色谱-质谱联用高分辨质谱分析

种属特征性多肽的寻找及验证是掺假鉴别的关键, 通过液相色谱-质谱联用高分辨质谱的扫描, 实现对种属特征性多肽的筛选。

1.3.2.1 仪器条件

色谱条件: C₁₈色谱柱(75 μ m $\times$ 100 mm, 1.7 μ m); 流动相: A相为0.1%甲酸; B相为0.1%乙腈。色谱梯度为: 0 min, 3% B相; 2 min, 8% B相; 48 min, 22% B相; 53 min, 40% B相; 55 min, 80% B相; 59 min, 80% B相; 61 min, 0% B相; 65 min, 0% B相, 每个肉类样品最终上样量为1.5 μ g左右, 每个样品采集3次数据。

质谱条件: 喷雾电压2 100 V; 毛细管温度275 $^{\circ}$ C; 全扫描分辨率60 000 FWHM; 扫描质量范围为350~1 600; 自动增益值 1×10^6 ; 进样时间50 ms; 二级扫描; topN30; 分辨率15 000 FWHM; 自动增益值 1×10^5 ; 进样时间60 ms; 碰撞能量27 V。

1.3.2.2 数据分析

用Maxquant软件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, 可变修饰为氧化(蛋氨酸)、乙酰化(N-端), 固定修饰为脲甲基修饰(半胱氨酸)。勾选异亮氨酸等于亮氨酸设置(I=L), 为了获得尽可能多的多肽定量信息, 选择所有定量肽段信息选项。其他参数为Maxquant默认值。利用非标记定量的结果, 选取每个物种中独有的多肽信息, 去掉含有Miss Cleavage的多肽, 获得相对特异性多肽。

1.3.3 液相色谱-质谱联用三重串联四极杆质谱分析

将高分辨质谱筛选的多肽信息转化为液相色谱-质谱联用三重串联四极杆质谱SRM模式, 构建多肽的定性及定量分析方法。

1.3.3.1 仪器条件

色谱条件: Hypersil GOLD C₁₈色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.9 μ m); 流速0.2 mL/min; 柱温40 $^{\circ}$ C; 进样量50 μ L; 流动相由A相0.1%甲酸-水, B相0.1%甲酸-乙腈, 色谱梯度为: 0~0.2 min, 3% B~10% B; 0.2~16 min, 10%~40% B; 16~17 min, 40% B~80% B; 17.5~18.5 min, 80% B~3% B。

质谱条件: 喷雾电压3 500 V; 鞘气压力38 arb; 辅

气压力15 arb; 离子传输管温度275 ℃; 离子源雾化温度380 ℃ 传输线温度275 ℃; 离子源温度380 ℃; 采集周期0.3 s; 碰撞气压力1.5 mTorr; Q1和Q3分辨率都为0.7。

1.3.3.2 定性分析

依据丰度信息, 选择了羊肉、鸭肉各条特征性多肽 (不含漏切位点, 不含甲硫氨酸, 不含NXS/T的糖基化基序), 导入Pinpoint软件, 利用该软件自动导出离子对与碰撞能量信息, 自动生成最后的采集方法。该SRM方法中离子对信息见表1。

表 1 羊肉和鸭肉SRM采集参数
Table 1 SRM acquisition parameters for lamb and duck

肽段编号	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	保留时间/min	离子模式	碰撞能量/V
羊_1	468.751	537.632	7.98	正模式	19
	468.751	594.684	7.98	正模式	19
	468.751	695.788	7.98	正模式	19
羊_2	558.607	416.496	5.19	正模式	22
	558.607	545.611	5.19	正模式	22
	558.607	673.741	5.19	正模式	22
羊_3	613.643	504.556	7.87	正模式	24
	613.643	641.696	7.87	正模式	24
	613.643	756.783	7.87	正模式	24
羊_4	698.788	446.519	14.31	正模式	27
	698.788	561.607	14.31	正模式	27
	698.788	674.765	14.31	正模式	27
羊_5	718.266	488.559	5.53	正模式	28
	718.266	617.674	5.53	正模式	28
	718.266	745.804	5.53	正模式	28
羊_6	766.308	462.522	6.89	正模式	29
	766.308	561.654	6.89	正模式	29
	766.308	724.828	6.89	正模式	29
羊_7	798.886	425.460	13.75	正模式	30
	798.886	554.575	13.78	正模式	30
	798.886	717.749	13.78	正模式	30
羊_8	935.018	537.587	15.24	正模式	35
	935.018	736.795	15.30	正模式	35
	935.018	849.954	15.30	正模式	35
鸭_1	564.195	472.560	8.14	正模式	22
	564.195	601.675	8.14	正模式	22
	564.195	829.987	8.15	正模式	22
鸭_2	577.182	445.535	6.75	正模式	23
	577.182	546.639	6.75	正模式	23
	577.182	659.797	6.75	正模式	23
鸭_3	579.175	484.571	8.65	正模式	23
	579.175	718.823	8.71	正模式	23
	579.175	831.981	8.71	正模式	23
鸭_4	672.752	488.559	7.33	正模式	26
	672.752	601.718	7.33	正模式	26
	672.752	817.910	7.33	正模式	26
鸭_5	714.813	417.441	8.27	正模式	28
	714.813	530.600	8.27	正模式	28
	714.813	659.714	8.27	正模式	28
鸭_6	715.851	418.466	7.24	正模式	28
	715.851	517.598	7.24	正模式	28
	715.851	675.753	7.21	正模式	28

续表1

肽段编号	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	保留时间/min	离子模式	碰撞能量/V
鸭_7	808.937	435.541	10.74	正模式	31
	808.937	635.777	10.74	正模式	31
	808.937	692.829	10.74	正模式	31
鸭_8	822.905	490.529	13.43	正模式	31
	822.905	589.661	13.43	正模式	31
	822.905	704.748	13.43	正模式	31
鸭_9	949.643	496.535	14.52	正模式	35
	949.643	624.665	14.55	正模式	35
	949.643	820.912	14.52	正模式	35
鸭_10	1 039.681	475.561	14.64	正模式	35
	1 039.681	546.639	14.64	正模式	35
	1 039.681	659.797	14.67	正模式	35

1.3.3.3 基于特征多肽羊肉中鸭肉含量成分的测定

将提取的纯羊肉和鸭肉段提取溶液进行不同比例的混合, 确保混合比例为1%、5%、10%、20%、50%, 制作标准曲线, 质量浓度跨度范围可根据实际情况进行调整。分别以鸭肉与羊肉混合比例为横坐标, 以所选取的鸭肉多肽或羊肉多肽选择离子峰面积为纵坐标, 将待测样本带入该标准曲线进行计算, 得出羊肉和鸭肉的混合比例。

整个实验流程如图1所示。

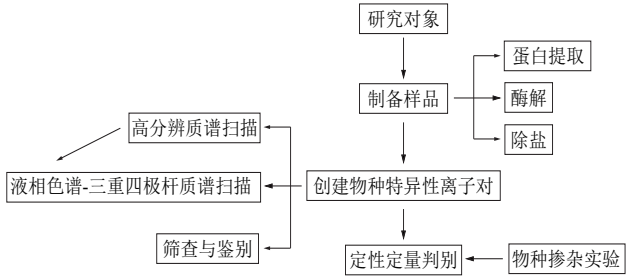


图 1 实验流程图

Fig.1 Experimental flow chart

2 结果与分析

2.1 高分辨质谱特征多肽的识别

动物蛋白被胰蛋白酶酶解后, 由小分子质量的多肽组成, 将猪肉、牛肉、鸡肉、羊肉和鸭肉经酶解处理后, 用高分辨质谱对小分子多肽进行非标记定量分析, 并利用Uniprot全库进行数据的检索^[22]。利用非标记定量的结果, 选取每个物种中独有的多肽信息, 去掉含有Miss Cleavage的多肽, 鉴定到的各个物种相对于其他4种物种专属性的多肽条数为: 鸡339条、鸭125条、猪426条、牛337条、羊152条。其中, 鸡和鸭都为鸟纲家禽类, 羊、牛、猪为哺乳纲真兽亚纲动物。

2.2 三重串联四极杆质谱SRM模式多肽的鉴别

三重串联四极杆质谱分析技术中的SRM模式, 通过同时监测目标肽段的多个子离子信息, 能够避免复杂

基质背景干扰,在定性和定量分析上具有无可比拟的优势。通过高分辨质谱筛选出目标肽段,利用三重串联四极杆质谱SRM模式可以实现对种属特征性多肽的定性及定量分析。

通过高分辨质谱数据,获得的相关种属特异性多肽去掉含漏切位点,含甲硫氨酸,含NXS/T糖基化基序序列之后^[23],根据多肽本身的强度信息,选出前30位的多肽,在TSQ上进行SRM验证,排除易受干扰,峰形差,响应低的离子对,最终选择了羊肉多肽8条,鸭肉多肽10条作为定性离子的母离子,具体见表1。图2分别列举了鸭肉和羊肉的总离子流图,以及多肽鸭_2和羊_5的子离子选择离子流图。

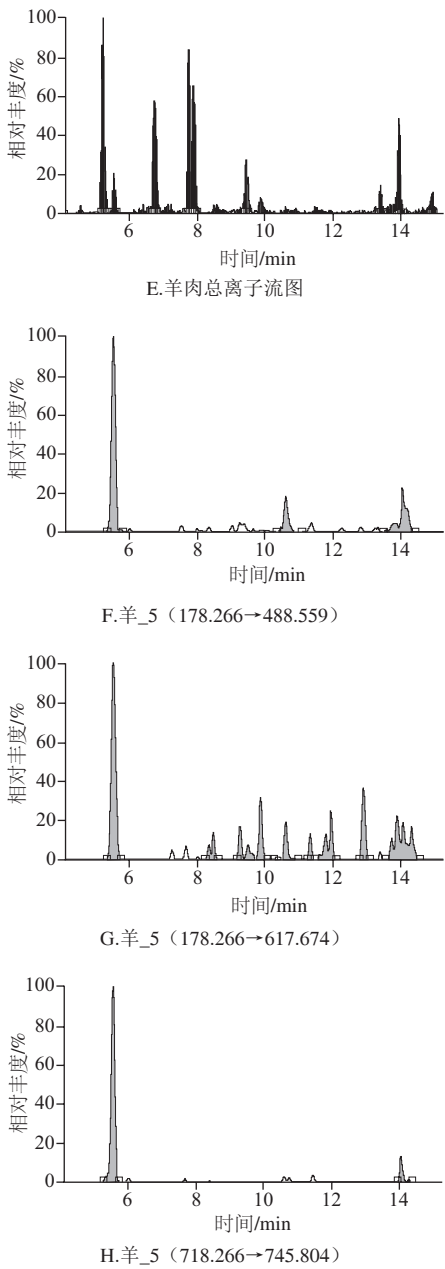
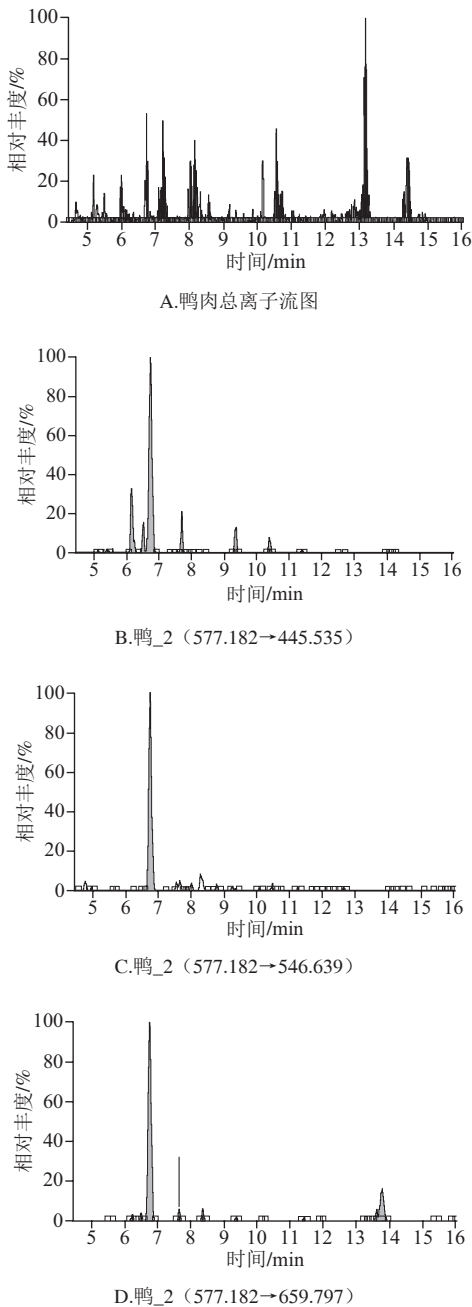


图2 羊肉和鸭肉总离子流图和提取离子流图
Fig.2 TIC and SRM chromatograms of lamb and duck

2.3 方法的线性关系和灵敏性

表2 定量分析选择的离子对信息以及线性关系					
肽段编号	母离子 (m/z)	定量离子 (m/z)	定性离子 (m/z)	线性方程	相关系数
羊_2	558.607	637.74	416.50、545.61	$Y=538.148+19.594.2X$	0.999 0
羊_4	698.788	446.52	561.60、674.77	$Y=-92.988.9+13.718.5X$	0.999 0
羊_5	718.266	488.56	617.60、745.80	$Y=63.210.6+12.286.5X$	0.999 2
羊_6	766.308	561.65	462.52、724.83	$Y=465.934+90.643.2X$	0.999 5
羊_8	935.018	736.80	537.59、849.95	$Y=-94.541.1+10.680.7X$	0.996 6
鸭_1	564.195	416.50	545.61、637.74	$Y=-9.596.85+15.566.7X$	0.997 9
鸭_2	577.182	561.60	446.52、674.77	$Y=35.939.4+13.470.1X$	0.996 5
鸭_4	672.752	488.56	617.60、745.80	$Y=-627.852+5.663.51X$	0.998 5
鸭_7	808.937	462.52	561.65、724.83	$Y=4.881.09+3.399.61X$	0.996 6
鸭_10	1 039.681	537.59	736.80、849.95	$Y=-7.584.34+7.820.37X$	0.999 2

按照1.3.1节前处理方法,将鸭肉和羊肉的肽段提取溶液,按不同比例添加混合,利用SRM的方法,对多肽进行定量分析,考察该方法的线性关系和灵敏度。依据所呈的线性关系,最终选择了羊肉肽段5条,鸭肉肽段5条作为定量分析。通过表2可知,选择的这10条肽段都呈现出良好的线性关系,线性拟合度的平方值均达到0.99以上。根据肽段仪器的响应值及信噪比,最低可以检测0.5%比例的鸭肉掺假,灵敏度较高。

2.4 方法的准确度

为了考察方法的准确性,即方法测定值与真实值之间的差异。制作含有鸭肉、羊肉的混合肉样,按照前处理方法进行提取,上机,使用建立的方法体系测定混合肉样中鸭肉成分含量,检测该方法的准确程度,结果如表3所示。

表3 混合肉样中羊肉成分含量测定结果
Table 3 Results of determination of the percentage of lamb-derived ingredients in meat mixtures

肉样成分	鸭肉真实比例	鸭_1		鸭_2		鸭_4		鸭_7		鸭_10	
		实际值	回收率	实际值	回收率	实际值	回收率	实际值	回收率	实际值	回收率
鸭/羊	1	0.978	97.8	0.566	56.6	0.771	77.1	0.987	98.7	1.28	128
鸭/羊	5	6.21	124	6.203	124	6.6	132	4.21	84.1	6.29	126
鸭/羊	10	8.80	88.0	13.0	130	12.9	129	6.91	69.1	11.2	112
鸭/羊	25	29.4	118	27.2	109	26.6	106	18.6	74.3	21.5	86.2
鸭/羊	50	63.1	126	49.7	99.4	66.3	133	47.0	94.0	51.0	102
平均值			111		104		116		84.0		111

总体来看,该方法体系测定结果与真实值较为接近,用鸭_1、鸭_2、鸭_4、鸭_7、鸭_10定量离子检测的5个样本回收率平均为111%、104%、116%、84.0%、111%,说明该方法具有较高的准确度,使用该方法体系能够较为准确的测定羊肉样本中鸭肉成分的含量。

3 讨论

本实验建立的掺假鉴别是以种属特征性多肽为分析对象,但动物由于产地、品质、喂养方式、部位等不同,肌肉中蛋白表达有显著不同,多肽链组成必然有差异^[24]。还需进一步开展相关研究工作,既要提高每个物种监测的多肽的数量,还要对不同产地、物种、部位特征性多肽进行大量的数据统计,避免假阳性及假阴性的概率,提高该方法定性的准确度。

氨基酸序列比核酸序列在加工过程更容易保存,因而利用液相色谱-串联质谱多肽鉴别掺假将在肉制品掺假中发挥更大的技术优势,同时也具有更重要的现实意义^[25],这也是后续需要进一步开展的工作。

4 结论

本实验研究、建立的以种属特征多肽为基础的液相

色谱-串联质谱分析测定方法体系,可以快速、灵敏、准确的检测出羊肉中的鸭肉成分。最终选择了羊肉多肽8条,鸭肉多肽10条作为定性离子的母离子,同时挑选出羊肉,鸭肉各5条肽段作为定量离子。该方法体系检出限为0.5%鸭肉定性判别,定量限为1%鸭肉掺假判别。构建的定量离子对肽段线性关系良好,均达到0.99以上,该方法准确度、灵敏度高、便于批量操作,具有广阔的应用前景。

参考文献:

[1] 李宗梦,赵良娟,赵宏,等.肉及肉制品动物源性成分鉴别技术研究进展[J].食品研究与开发,2014,35(18):122-126. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2014.18.032.

[2] 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. DOI:10.1016/j.meatsci.2012.02.015.

[3] SENTANDREU M Á, SENTANDREU E. Authenticity of meat products: tools against fraud[J]. Food Research International, 2014, 60(6): 19-29. DOI:10.1016/j.foodres.2014.03.030.

[4] DAANE K M, MIDDLETON M C, SFORZA R, et al. Development of a multiplex PCR for identification of vineyard mealybugs[J]. Environmental Entomology, 2011, 40(6): 1595-1603. DOI:10.1603/EN11075.

[5] 山东出入境检验检疫局,中国检验检疫科学研究院,辽宁出入境检验检疫局. GB/T 21101—2007 动物源性饲料中猪源性成分定性检测方法PCR方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.

[6] 辽宁出入境检验检疫局,宝生物工程(大连)有限公司,中国检验检疫科学研究院. SN/T 2051—2008 食品、化妆品和饲料中牛羊猪源性成分检测方法: 实时PCR法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.

[7] LIU L, CHEN F C, DORSEY J L, et al. Sensitive monoclonal antibody-based sandwich ELISA for the detection of porcine skeletal muscle in meat and feed products[J]. Journal of Food Science, 2006, 71(1): M1-M6. DOI:10.1111/j.1365-2621.2006.tb12393.x.

[8] 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. DOI:10.1016/j.foodcont.2007.02.010.

[9] PINTO A D, BOTTARO M, BONERBA E, et al. Occurrence of mislabeling in meat products using DNA-based assay[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(4): 2479-2484. DOI:10.1007/s13197-014-1552-y.

[10] BARAKAT H, EL-GARHY H A, MOUSTAFA M M. Detection of pork adulteration in processed meat by species-specific PCR-QIAxcel procedure based on D-loop and cytb genes[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(23): 9805-9816. DOI:10.1007/s00253-014-6084-x.

[11] NEJAD F P, TAFVIZI F, EBRAHIMI M T, et al. Optimization of multiplex PCR for the identification of animal species using mitochondrial genes in sausages[J]. European Food Research and Technology, 2014, 239(3): 533-541. DOI:10.1007/s00217-014-2249-1.

[12] MIGUEL A S, ENRIQUE S. Peptide biomarkers as a way to determine meat authenticity[J]. Meat Science, 2011, 89(3): 280-285. DOI:10.1016/j.meatsci.2011.04.028.

[13] GALLARDO J M, ORTEA I, CARRERA M. Proteomics and its applications for food authentication and food-technology research[J]. Trac Trends in Analytical Chemistry, 2013, 52(12): 135-141. DOI:10.1016/j.trac.2013.05.019.

- [14] MONTOWSKA M, POSPIECH E. Authenticity determination of meat and meat products on the protein and DNA basis[J]. *Food Reviews International*, 2011, 27(1): 84-100. DOI:10.1080/87559129.2010.518297.
- [15] MAMONE G, PICARIELLO G, NITRIDE C, et al. The role of proteomics in the discovery of marker proteins of food adulteration[J]. *Food Microbiology and Food Safety*, 2013, 2: 465-501. DOI:10.1007/978-1-4614-5626-1_24.
- [16] LEITNER A, CASTRO-RUBIO F, MARINA M L, et al. Identification of marker proteins for the adulteration of meat products with soybean proteins by multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Proteome Research*, 2006, 5(9): 2424-2430. DOI:10.1021/pr060145q.
- [17] CHRISTOPH V B, JORG D, DIETMAR W, 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 Agriculture and Food Chemistry*, 2013, 61(49): 11986-11994. DOI:10.1021/jf404121b.
- [18] BARGEN C V, BROCKMEYER J, HUMPH H U, et al. Meat authentication: a new HPLC-MS/MS based method for the fast and sensitive detection of horse and pork in highly processed food[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(39): 9428-9435. DOI:10.1021/jf503468t.
- [19] SENTANDREU M A, FRASER P D, HALKET J, et al. A proteomic-based approach for detection of chicken in meat mixes[J]. *Journal of Proteome Research*, 2010, 9(7): 3374-3383. DOI:10.1021/pr9008942.
- [20] MONTOWSKA M, WEI R, ALEXANDER M R, et al. Tryptic digestion coupled with ambient DESI and LESA mass spectrometry enables identification of skeletal muscle proteins in mixtures and distinguishes between beef, pork, horse, chicken and turkey meat[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(9): 4479-4487. DOI:10.1021/ac5003432.
- [21] 王继峰, 赵新元, 赵焱. 酶切过程中肽段过烷基化对蛋白质定性和定量分析的影响[J]. *色谱*, 2013, 10(10): 927-933. DOI:10.3724/SP.J.1123.2013.04041.
- [22] MONICA C, BENITO C, DANIEL L F, et al. Fast monitoring of species-specific peptide biomarkers using high intensity focused ultrasound assisted tryptic digestion and selected MS/MS ion monitoring[J]. *Analytical Chemistry*, 2011, 83(14): 5688-5695. DOI:10.1021/ac200890w.
- [23] MONTOWSKA M, ALEXANDER M R, TUCKER G A. Rapid detection of peptide markers for authentication purposes in raw and cooked meat using ambient liquid extraction surface analysis mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(20): 10257-10265. DOI:10.1021/ac502449w.
- [24] ORDUNA A R, HUSBY E, YANG C T, et al. Assessment of meat authenticity using bioinformatics, targeted peptide biomarkers and high-resolution mass spectrometry[J]. *Food Additives and Contaminants-Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 2015, 32(10): 1-9. DOI:10.1080/19440049.2015.1064173.
- [25] MONTOWSKA M, ALEXANDER M R, TUCKER G A, et al. Authentication of processed meat products by peptidomic analysis using rapid ambient mass spectrometry[J]. *Food Chemistry*, 2015, 187: 297-304. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.04.078.