

Идентификация и количественное определение мышечной ткани на основе контроля прототипических пептидов с использованием метода мониторинга заданных реакций

**Д.В. Хвостов¹, *Н.Л. Вострикова¹, А.В. Жердев²,
Е.А. Зверева², А.А. Курзова¹**

¹Федеральный научный центр Пищевых систем им. В.М. Горбатова Российской академии наук, 109316, Российская Федерация, Москва, ул. Талалихина, 26

²Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, 19071 Российская Федерация, г. Москва, Ленинский проспект, д.33, стр. 2

*Адрес для переписки: Вострикова Наталья Леонидовна E-mail: n.vostrikova@fnpcs.ru

Поступила в редакцию 19 июля 2019 г., после исправления — 21 ноября 2019 г.

Одной из основных проблем современного производства мясных продуктов является качество мясного сырья, которое зависит от разных факторов, включая генетические составляющие, условия транспортирования, производства и переработки. К наиболее значимым компонентам мяса относятся белки, общее содержание, структура и функциональное состояние которых в составе этой сложной биологической системы, с большим количеством взаимодействующих составляющих, постоянно изменяется. Для изучения межвидовых и внутривидовых особенностей белков мяса, трансформации их в процессе созревания и технологической обработки требуются современные аналитические технологии, основанные на системном подходе к анализу. Широкие возможности в этом направлении открывает протеомика, как методологии изучения белков в определенной системе и в определенное время, позволяющая идентифицировать и разрабатывать точные аналитические методы поиска биомаркеров и выявления недобросовестных практик. Учитывая высокую добавленную стоимость и многокомпонентность состава, готовые мясные продукты относятся к числу наиболее подверженных фальсификации. В работе представлена методика высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором (ВЭЖХ-МС), адаптированная для обнаружения и количественного определения двух различных видов мяса (говядина и свинина) в сложной биологической матрице, такой как бесструктурные фарши. После выделения белков и расщепления их трипсином были выбраны видоспецифичные пептидные маркеры для каждого вида животного с целью количественного определения. Методика была апробирована на модельных образцах смеси мышечной ткани двух видов животных. Установлена хорошая чувствительность с возможностью количественного определения мышечной ткани каждого вида животного, при использовании специальных градуировочных графиков. Разработанная методика может найти широкое применение у контролирующих организаций, направленных на противодействие несоответствиям по скрытой замене видов мяса более дешевым или низкосортными сырьем.

Ключевые слова: Биомаркер, прототипические пептиды, ВЭЖХ-МС, видовая идентификация.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2019, vol. 23, no. 4, pp. 580-586

DOI: 10.15826/analitika.2019.23.4.012

Quantitative identification of muscular tissue by the means of prototypic peptides using the multiple reaction monitoring method

D.V. Khvostov¹, *N.L. Vostrikova¹, A.V. Zherdev², E.A. Zvereva², A.A. Kurzova¹

¹V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, 109316 Moscow, Russian Federation

²*Federal State Institution «Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences», Leninsky prospect, 33, build. 2, 119071 Moscow, Russian Federation*

Corresponding author: Natalya L. Vostrikova, E-mail: n.vostrikova@fncps.ru

Submitted 19 July 2019, received in revised form – 21 November 2019.

One of the main problems of modern production of meat products is the quality of raw meat, which depends on various factors including genetic components, conditions of transportation, production and processing. The most important components of meat are proteins, the total content, structure and functional state of which in this complex biological system with many interacting components is constantly changing. In order to study the interspecific and intraspecific features of meat proteins, their transformations in the process of maturation and processing requires modern analytical technologies based on the systematic approach to the analysis. Proteomics, as a methodology for studying proteins in a certain system and at a certain time, opens wide opportunities in this direction, allowing to identify and develop accurate analytical methods for searching biomarkers and identifying unfair practices. Given the high added value and multicomponent composition, finished meat products are among the most susceptible to adulteration. Current paper presents a technique of high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detector (**HPLC-MS**) adapted for the detection and quantification of two different types of meat (beef and pork) in a complex biological matrix such as structureless minced meat. After the protein isolation and trypsin cleavage, species-specific peptide markers were selected for each animal species for the quantification. The technique was tested on model samples of a mixture of muscle tissue of the two species of animals. A good sensitivity was established with the possibility of quantitative determination of muscle tissue of each animal species using special calibration graphs. The developed technique can find wide application at the supervising organizations aimed at counteracting the discrepancies in the hidden replacement of types of meat by cheaper or low-grade raw materials.

Keywords: Biomarker, prototypical peptides, HPLC-MS, species identification.

ВВЕДЕНИЕ

Недостаточный контроль мясных изделий, как на этапе их производства, так и в торговой сети, приводит к увеличению доли несоответствия в маркировке продукции, что является актуальной проблемой. Это связано с расширением прав и появлением новых мясоперерабатывающих предприятий с возможностью выпуска новой продукции по собственной рецептуре. Производитель, зная о текущих методах контроля, может идти на обман, используя растительный белок, углеводные добавки, замену низкосортным сырьем.

Выявление основных белков и пептидов, влияющих на качественные характеристики, функциональность, а главное безопасность мясного сырья и продуктов, является весьма актуальной задачей для современной биотехнологии и биохимии. В последние 15 лет во всем мире проводятся обширные исследования по изучению веществ белковой и пептидной природы, содержащихся в мясном сырье и готовых мясных продуктах, а также образующихся в процессе различной технологической обработки и тем или иным способом обуславливающих качественные и функциональные характеристики, а также безопасность готовых продуктов питания. В связи с этим, важнейшим путем обеспечения безопасности и качества мясной продукции на сегодняшний день является формирование интегрированного научного и технологического подхода по выявлению и идентификации тканеспецифичных веществ белковой и пептидной природы.

Для определения сложных изменений, которые происходят в мясных продуктах, необходимо ис-

пользовать методологические подходы, при которых возможно регистрировать сотни и тысячи белков. Широкие возможности в этом направлении открывает протеомика, как методология изучения белков в определенной системе и в определенное время, позволяющая идентифицировать и устанавливать сложные закономерности между состоянием белков, функционально-технологическими свойствами сырья и способами обработки, разрабатывать точные аналитические методы поиска биомаркеров и выявления недобросовестных практик. Наиболее значимым инструментом протеомики является изучение белковых карт тканей человека и животных с целью выявления потенциальных биомаркеров различного состояния (аутолиз, автолиз) и изменения тканей. Таким образом, с использованием методов протеомики мы можем судить о количественных характеристиках конкретных белковых молекул. Однако до сих пор отсутствует системность при изучении мясной продукции и нет стандартизированной методики, определяющей долю мышечной ткани в мясной продукции.

В связи с этим, в работах, проведенных на базе ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, с помощью протеомных технологий в исследуемых образцах мяса и в специально выработанных колбасных изделиях, при помощи идентификации белкового состава методом двумерного электрофореза было определено несколько тканеспецифичных белков. Также были выделены специфичные соевый и куриный белки, отнесенные к маркерам фальсификации продукции [1].

Классическим методом количественного определения в протеомике является использование изотопной метки, модификация которого насчитывает уже более 40 видов [2]. В 2009 году для изучения динамических изменений белкового состава внутри клетки, была установлена зависимость масс-спектрометрического сигнала от концентрации белков и получены линейные диапазоны концентрации от 1 нМ до 1 мкМ. Чувствительность определения белков по сравнению с гель-электрофорезом возрастает на несколько порядков. Методика не использует изотопные метки [3]. Сравнительно недавно была преодолена сложность при исследовании фосфорилированных белков. Различные пост-трансляционные модификации белков с высокой чувствительностью и специфичностью изучаются методом мониторинга выбранных реакций (Selected Reaction Monitoring – **SRM**) [4].

В последнее время набирает силу способ идентификации видоспецифических молекулярных маркеров в области анализа пищевых продуктов, основанный на сочетании двух методов: высокоэффективной жидкостной хроматографии (**ВЭЖХ**) и масс-спектрометрии (**МС**), применяемой для обнаружения пептидов. Комбинация ВЭЖХ-МС детектирования позволила обнаружить мясо птицы в мясных смесях с очень низким содержанием (0.5 % мас.) и с высокой достоверностью [5]. В более поздних исследованиях в вареных мясных изделиях были выявлены небольшие количества примеси говядины, свинины, курицы, утки и гуся (1.0 % мас.) [6]. Благодаря разработкам ученых, специфические пептиды, происходящие из легкой цепи миозина 1 и 2, могут быть идентифицированы для мяса буйволов и овец. Таким образом, можно обнаружить до 0.5 % мас. мяса буйвола как в сырье, так и в термообработанной смеси [7]. Показана большая эффективность ВЭЖХ-МС обнаружения пептидов по сравнению с методами полимеразной цепной реакции (**ПЦР**) и иммуноферментного анализа (**ИФА**) для определения происхождения в продуктах, подвергнутых сильной термической обработке или кислотнo-щелочной экстракции, например, в случае желатина, где пептиды свиного и бычьего коллагена могут быть выявлены вплоть до 0.4–1.0 % мас. примеси в образце [8].

В связи с вышеизложенным, целью данной работы была разработка быстрой, высокоспецифичной и достоверной методики мультивидовой идентификации и количественного определения доли мышечной ткани, для подтверждения градации мясной продукции. Представленная в статье методология охватывает два основных вида животных (свинина, говядина), используемых в качестве мясного сырья и представляющих наибольший интерес.

В соответствии с поставленной целью исследование включало решение следующих задач: разработку с помощью мониторинга заданных реакций методики масс-спектрометрической идентификации

четырёх прототипических пептидов мышечной ткани для двух видов животных; определение пределов обнаружения и диапазонов количественного определения для выбранных маркеров и экспериментальное их подтверждение.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

Модельные смеси фаршей мышечной ткани готовили на опытной установке в соответствии со стандартной промышленной процедурой. Был подготовлен набор образцов, состоящий из 5 уровней концентраций: 75/25, 50/50, 25/75, 5/95, 100 % мас. мышечной ткани говядины и свинины (*m.L. dorsi*), соответственно.

Реагенты и растворители

Деионизированную воду получали с помощью системы очистки воды Milli-Q Merck (Millipore). Трис (гидроксиэтил)-аминометан (99+ %), соляная кислота (≥ 37 %), муравьиная кислота (≥ 95 %), DL-дитиотреитол (≥ 98 %), йодацетамид (кристаллический), трипсин из поджелудочной железы свиньи (1000-2000 единиц БАЭЭ / мг твердого вещества), ацетонитрил (≥ 99.9 %) и бикарбонат аммония (≥ 99 %) были использованы фирмы Sigma Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США).

Экстракция белка

На аналитических весах отбирали по 50.0 ± 0.0 мг каждого образца модельной смеси. Добавляли к навеске 500 мкл денатурирующего буфера (дезоксиколлат натрия 10 %, 25 мМ бикарбонат аммония) и перетирали в ступке до полного растворения. Образцы гомогенизированной мышечной ткани центрифугировали при 10000 об/мин в течение 15 минут при 4 °С, отбирали 10 мкл пробы в 1.5 мл пробирки (для последующего гидролиза). Остатки супернатанта замораживали при -20 °С и хранили не более 1 месяца.

Трипсинолиз белка

Дисульфидные мостики восстанавливали, добавляя 2 мкл дитиотреитола (0.1 М в воде) и инкубируя образцы при 80 °С в течение 20 минут. Затем сульфгидрильные группы алкилировали, добавляя 3 мкл йодацетамида (0.25 М в воде) и инкубируя в темноте в течение 1 часа при комнатной температуре. Избыток йодацетамида нейтрализовали путем добавления 20 мкл дитиотреитола (0.2 М в воде) и инкубации при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем содержание белка измеряли с помощью набора для анализа белка Quant-it (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием флуориметра Qubit (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя. Расщепление трипсином осуществляли с использованием соотношения фермента к субстрату 1 : 50, инкубируя в течение

ночи при 37 °С. Ферментативный гидролиз останавливали добавлением 50 мкл муравьиной кислоты (10 % по объему в воде). Образцы хранили при -20 °С до проведения анализа. Непосредственно перед инъекцией образцы центрифугировали при 15000 об/мин в течение 10 минут при 4 °С и надосадочную жидкость сохраняли для анализа.

ВЭЖХ / ИЭР-МС / МС анализ

Пептиды, полученные ферментативным расщеплением, анализировали с использованием обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с tandemной масс-спектрометрией с ионизацией электрораспылением (ИЭР-МС / МС).

Для хроматографического анализа использовали колонку ZORBAX Eclipse Plus C18 с быстрым разрешением HD 2.7 мкм (50 × 2.1 мм; Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). Разделение проводили, используя систему Agilent 1260 Infinity ВЭЖХ (США). Скорость потока была установлена на уровне 0.4 мл / мин, температура колонки 30 °С, а температура образца 19 °С; элюент А представлял собой воду с 0.1 % (об. / об.) муравьиной кислоты, элюент В - ацетонитрил с 0.1 % (об. / об.) муравьиной кислотой. Градиентное элюирование выполняли по следующим параметрам: 0 мин 95 % А, 0–10 мин от 95 % А до 40 % А, 10–15 мин от 40 % А до 0 % А, 15–20 мин 0 % А, 20–21 мин от 0 % А до 95 % А, 21–25 мин 95 % А (общее время анализа 25 минут). Объем впрыска составлял 10 мкл для всех типов образцов.

Детекцию пептидов осуществляли с помощью трехкврупольного масс-спектрометра (6410, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) со следующими параметрами: детектирование 0–25 минут, режим положительной ионизации; напряжение на капилляре 4000 В, температура газа 250 °С; давление газа на распылителе 25 psi (206.85 кПа); температура капилляра 250 °С. Для метода мониторинга выбранных реакций (SRM) отслеживаемые переходы представлены в табл. 1. Первый дочерний ион был использован в качестве

количественного показателя, второй и третий – в качестве подтверждающих.

Данные ВЭЖХ / ИЭР-МС были получены с использованием программного обеспечения MassHunter B.04.00 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). Градуировочные графики были построены с использованием расчета площади полного ионного тока «ТIC» (сумма двух отслеживаемых переходов), а также сигнала первого перехода (наиболее интенсивного), что дало полностью сопоставимые результаты.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Маркерная идентификация пептидов

Были проанализированы модельные смеси мясного фарша, приготовленные из нескольких видов животных. Белки экстрагировали и расщепляли трипсином (подробности в экспериментальном разделе), а пептидные смеси анализировали методом ВЭЖХ-МС. Анализ белков проводили с помощью биомоделирования в программе Skyline [9], способной проводить теоретическое расщепление белков и выводить список SRM для каждого пептида. Основные белки, выбранные для определения идентификации мышечной ткани мясных продуктов, представлены миоглобином и лактатдегидрогеназой.

Для выбора потенциальных биомаркеров были отобраны пептиды, длина которых превышала шесть аминокислот, в соответствии с ранее указанными протоколами [10]. Таким образом, длина пептида обеспечивает видоспецифичность мышечного белка. Затем пептидные ионы-кандидаты были подвергнуты перекрестной проверке на хроматограмме мышечной ткани другого вида животного и были отобраны только те пептиды, которые присутствовали в одном типе мяса. Кроме того, для обеспечения специфичности пептида был выполнен поиск в базе данных BLAST (англ. *Basic Local Alignment Search Tool* - средство поиска основного локального выравнивания), представленный на рис. 1. Из идентифицированных видоспецифичных маркерных пептидов два пептида для каждого вида мяса были окончательно определены с учетом следующих факторов: высокая

Таблица 1

Идентификационная характеристика маркерных пептидов свинины (*Sus scrofa*) и говядины (*Bos taurus*) для ВЭЖХ-МС методики

Table 1

Identification characteristics of pork (*Sus scrofa*) and beef (*Bos taurus*) marker peptides for HPLC-MS methods

Пептид	Вид животного	Время удерживания, мин	Материнский ион (<i>m/z</i>)	Дочерние ионы (<i>m/z</i>)	Энергия соударения, мВ
HPSEFGADAQAAMSK	<i>Bos taurus</i>	6.3	511.6	635.3; 507.3; 641.3	13.6
SNVSDAVAQSAR	<i>Bos taurus</i>	5.8	602.8	904.4; 702.4; 532.3	19.7
HPGDFGADAQGAMSK	<i>Sus scrofa</i>	6.8	496.9	621.3; 493.2	13.1
THVSEAVAQSTR	<i>Sus scrofa</i>	4.0	429.2	562.3; 491.3; 625.3	10.7

Score	Expect	Method	Identities	Positives		
276 bits(705)	3e-93	Compositional matrix adjust.	136/154(88%)	142/154(92%)		
Query 1	MGLSDGEWQLVLA	WGKVEADVAGHGQ	VEADVAGHGQVLR	LRLFTGHPETLEK	FDKFKHLKTEAE	MKASE 60
Sbjct 1	MGLSDGEWQLVLA	WGKVEADVAGHGQ	VEADVAGHGQVLR	LRLFKGHPETLEK	FDKFKHLKSEDE	MKASE 60
Query 61	DLKKHGNTVLTAL	GGILKKKGHHEAE	VKHLAESHANKHK	IPVKYLEFISDAI	IHLVLAHKH 120	
Sbjct 61	DLKKHGNTVLTAL	GGILKKKGHHEAE	VKHLAESHANKHK	IPVKYLEFIS+AIT	VL +KH 120	
Query 121	PSDFGADAQAAM	SKALELFRNDMAA	QYKVLGFHG 154			
Sbjct 121	P DFGADAQ AMS	KALELFRNDMAA	+YK LGF G 154			
Sbjct 121	PGDFGADAQAAM	SKALELFRNDMAA	KYKELGFQG 154			

Рис. 1. Сравнение аминокислотной последовательности белка миоглобина у свинины (*Sus scrofa*) и говядины (*Bos taurus*) при помощи интернет ресурса BLAST [11].

Fig. 1. Comparison of the amino acid sequence of myoglobin protein in pork (*Sus scrofa*) and beef (*Bos taurus*) using the BLAST Internet resource [11].

распространенность в мышечных тканях, хорошее отношение сигнал / шум при низких концентрациях, высокая специфичность, отсутствие пропущенных сайтов расщепления, специфичных для разрезания трипсином на обоих концах белковой цепи.

Идентифицированные маркерные пептиды с параметрами масс-спектрометрического детектора,

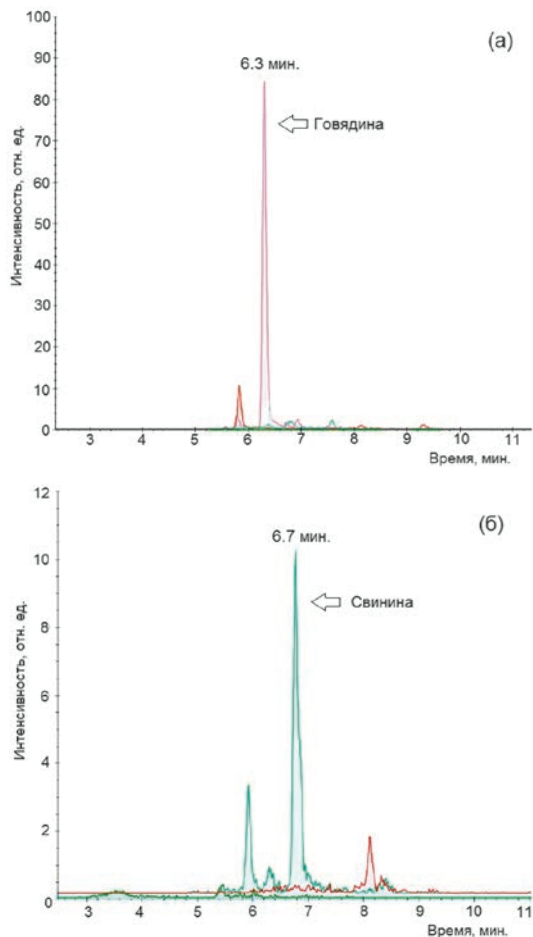


Рис. 2. Хроматограммы выбранных биомаркеров, отвечающих за идентификацию мышечной ткани двух видов животных в модельной смеси: говядина (а) и свинина (б).

Fig. 2. Chromatograms of selected biomarkers responsible for the identification of muscle tissue of two animal species in the model mixture: beef (a) and pork (b).

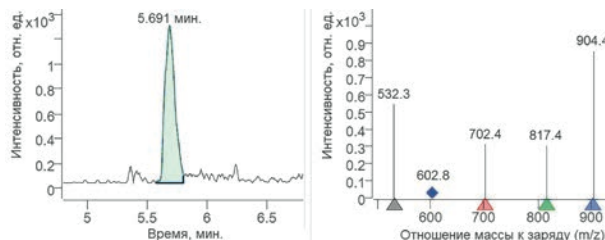


Рис. 3. Хроматограммы для видоспецифического пептида **SNVSDAVAQSAR** говяжьей лактатдегидрогеназы с указанием времени удерживания (5.691 мин.) и **SRM** переходами выбранного иона 602.8 m/z.

Fig. 3. Chromatograms for the species-specific SNVSDAVAQSAR peptide of beef lactate dehydrogenase with the retention time (5.691 min.) and SRM transitions of the selected ion 602.8 m/z.

приведены в табл. 1. Хроматограммы SRM пептидных маркеров для каждого вида представлены на рис. 2 (а, б). Для каждой хроматограммы отслеживались все переходы для всех видов (рис. 3), чтобы обеспечить чувствительность методики (каждый вид имеет свой пептидный маркер) и его селективность. Два из четырех выбранных маркерных пептида являются фрагментами саркоплазматического белка миоглобина. Так как в красном мясе содержится высокий уровень миоглобина, это обуславливает самое большое количество пептидных производных данного белка у говядины. Отобранные маркерные пептиды свинины (HPGDFGADAQGAMSK и THVSEAVAQSTR) были выбраны для тех же белков, что и в говядине при их количественной оценке. Но их содержание в свинине оказалось в разы меньше, чем в говядине.

Пептид миоглобина HPGDFGADAQGAMTK ранее использовался для обнаружения мяса конины [10]. Обнаружив данный фрагмент в аминокислотной последовательности миоглобина коровы, мы предложили использовать пептид HPSDFGADAQAAMSK, отличающийся несколькими фрагментами. Данный пептид показал очень хорошую специфичность и не обнаруживался в пробе свинины. Для пептидов THVSEAVAQSTR и SNVSDAVAQSAR лактатдегидрогеназы в пробах свинины и говядины, соответственно, сигнал был намного ниже, чем для пептидов миоглобина. Это дало нам основания для дальнейшего поиска маркерных белков.

Количественная оценка видов мяса

После выбора маркерных пептидов для каждого из исследуемых видов эти пептиды были проанализированы, чтобы выяснить пределы обнаружения (Limit of Detection – LOD) и количественного определения метода (Limit of Quantification – LOQ), а также линейность ответа при 5 % мас. содержании ткани в гомогенной смеси (рис. 4).

Целью данного этапа работы было количественное определение каждого вида мяса (в % мас.), присутствующего в модельных смесях. Для этого в хроматограммах были интегрированы площади

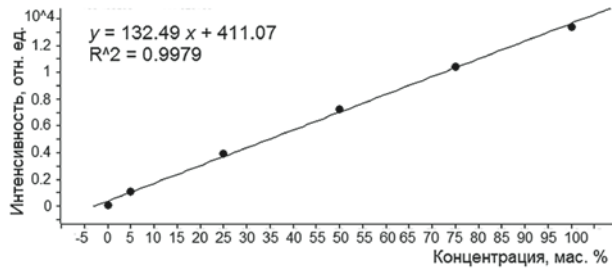


Рис. 4. Градуировочный график для видоспецифического пептида **SNVSDAVAQSAR** говяжьей лактатдегидрогеназы.

Fig. 4. Calibration function for SNVSDAVAQSAR species of beef lactate dehydrogenase peptide.

маркерных пептидов (сумма трех отслеживаемых переходов). Соотношение между площадью каждого маркерного пептида и площадью общего пептида было вычислено для нормализации данных и во избежание различий из-за возможных вариаций в эффективности экстракции белка, активности фермента и других факторов (табл. 2).

Пределы обнаружения и количественного определения определялись по градуировочным графикам с использованием формул:

$$LOD = 3.3 \times \frac{S_y}{S}, LOQ = 10 \times \frac{S_y}{S},$$

где S_y – стандартное отклонение отклика, S – тангенс угла наклона градуировочного графика.

Пределы обнаружения видов в модельных образцах находились в диапазоне 0.20 – 3.27 % мас., а пределы количественного определения – в диапазоне 0.61 – 9.91 % мас. от общего количества мяса.

Таким образом, разработанная методика способна обнаруживать даже небольшое присутствие мяса свинины и говядины в конечном продукте и, в случае массивной фальсификации, может с высокой точностью количественно определять пропорции добавленного мяса. Эти результаты дают возможность дальнейшей разработки методики для многокомпонентных и термообработанных мясных продуктов.

Значения коэффициента вариации для градуировочных графиков не превышали 20 %. Важно отметить, что только один из 4 пептидов показал **LOQ** выше 3.5 % мас. Для говядины оба пептида показали очень высокий сигнал чувствительности

определения: LOD ниже 2.9 % мас. Однако необходимо учитывать, что при низкой объемной доли добавленного мяса (на уровне 1.0-3.0 % мас.) происходит увеличение погрешности определения искомого аналита в пробе. Разработанная методика обладает хорошей специфичностью и чувствительностью. Полученные результаты представляют собой шаг вперед в области контроля качества мясной продукции и предупреждения роста несоответствий заявленному составу.

Выводы

Разработанная методика позволяет одновременно выявлять и количественно определять мышечную ткань для двух видов мяса (свинины и говядины) за непродолжительное время – около 25 минут. Выбранные пептидные маркеры были использованы для построения кривых регрессии с хорошей линейностью, позволяющей получить количественную оценку присутствующих видов мяса. Данная комплексная методология учитывает наиболее используемые виды животного сырья в мясном секторе и в будущем возможно ее применение к реальным промышленным продуктам. На основании полученных результатов установлена хорошая специфичность (без ложных обнаружений) и чувствительность (без ложных срабатываний). Данная методика может быть использована для определения различий между случайным загрязнением (технологически неустраняемая примесь) и сознательной фальсификацией. Протеомные стратегии, используемые в анализах качественных показателей мясного сырья, являются одним из перспективных средств, способствующих получению высокого класса продуктов животного происхождения [12-13].

Аналогичные подходы уже применяются в зарубежных странах для выявления примесей мяса других видов животных, что дает основание на применение данных методик для всей мясной продукции, в составе которой содержатся белки мышечного происхождения. Таким образом, предложенная методология, по нашему мнению, может найти достаточно широкое применение в лабораторном контроле.

Таблица 2

Уравнения регрессии, пределы обнаружения и количественного определения для выбранных видоспецифических пептидов

Table 2

Regression equations, detection and quantification limits for the selected species-specific peptides

Вид мяса	Пептид	Уравнение регрессии	R ²	LOD (мас. %)	LOQ (мас. %)
Говядина	HPSDFGADAQAAMSK	$y = 4469.76 \cdot x + 6559.33$	0.998	0.20	0.61
	SNVSDAVAQSAR	$y = 132.49 \cdot x + 411.07$	0.997	0.93	2.81
Свинина	HPGDFGADAQGAMSK	$y = 168.36 \cdot x + 8040.57$	0.964	3.27	9.91
	THVSEAVAQSTR	$y = 32.07 \cdot x + 32.68$	0.999	1.10	3.33

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 19-16-00108).

ACKNOWLEDGEMENTS

Current work was supported by the Russian Science Foundation, project no. 19-16-00108.

ЛИТЕРАТУРА

1. Study and identification of main proteins and peptides to determine the content of muscle protein in structureless cooked products by the method of two-dimensional electrophoresis follow by the time-of-flight mass spectrometry identification / N.L. Vostrikova [et al.] // *Foods and Raw Materials*. 2016. V. 4, № 2. P. 136-147.
2. Копылов А.Т., Згода В. Г. Количественные методы в протеомике // *Биомедицинская химия*. 2007. Т. 53, № 6. С. 613-643.
3. Копылов А.Т., Згода В.Г., Арчаков А.И. Количественный масс-спектрометрический анализ содержания белков в биологических пробах без использования изотопных меток // *Биомедицинская химия*. 2009. Т. 55, № 2. С. 125-139.
4. Получение пептидного стандарта для srm метода с помощью фосфорилирования *in vitro* / М.Г. Завьялова [и др.] // *Биомедицинская химия*. 2014. Т. 60. С. 668-676.
5. A proteomic based approach for detection of chicken in meat mixes / M.A. Sentandreu Fraser [et al.] // *Journal of Proteome Research*. 2010. V. 9. P. 3374–3383.
6. Montowska M., Fornal E. Label-free quantification of meat proteins for evaluation of species composition of processed meat products // *Food Chemistry*. 2017. V. 237, № 15. P. 1092–1100.
7. OFFGEL electrophoresis and tandem mass spectrometry approach compared with DNA-based PCR method for authentication of meat species from raw and cook ground meat mixtures containing cattle meat, water buffalo meat and sheep meat / V.M. Naveena [et al.] // *Food Chemistry*. 2017. V. 233. P. 311-320.
8. A mass spectrometry method for the determination of the species of origin of gelatine in foods and pharmaceutical products / H.H. Grundy [et al.] // *Food Chemistry*. 2016. V. 190. P. 276-284.
9. Программное обеспечение Skyline. [Электронный ресурс]: <https://skyline.ms/project/home/software/Skyline/begin.view> (дата обращения 11.03.2019)
10. Meat authentication via multiple reaction monitoring mass spectrometry of myoglobin peptides / A.D. Watson [et al.] // *Analytical Chemistry*. 2015. V. 87. P. 10315–10322.
11. Программное обеспечение BLAST. [Электронный ресурс]: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome (дата обращения 11.03.2019)
12. Vostrikova N.L., Chernukha I.M. Identification of tissue-specific proteins and peptides forming innovative meat products corrective properties to confirm authenticity of meat raw materials // *Foods and Raw Materials*. 2018. V. 6, № 1. P. 201-209.
13. Вострикова Н.Л., Чернуха И.М., Хвостов Д.В. Методологические аспекты идентификации тканеспецифических белков и пептидов, формирующих корректирующие свойства инновационных мясных продуктов (Обзор) / *Теория и практика переработки мяса*. 2018. Т. 3, № 3. С. 36-55.

REFERENCES

1. Vostrikova N. L. Chernukha I. M., Kulikovskiy A.V., Shishkin S. S. Study and identification of main proteins and peptides to determine the content of muscle protein in structureless cooked products by the method of two-dimensional electrophoresis follow by the time-of-flight mass spectrometry identification. *Foods and Raw Materials*, 2016, vol. 4, no. 2, pp. 136-147. doi:10.21179/2308-4057-2016-2-38-47
2. Kopylov A.T., Zgoda V.G. Kolichestvennyye metody v proteomike [Quantitative Methods in Proteomics]. *Biomeditsinskaya khimiia [Biomedical Chemistry]*, 2007, vol. 53, no. 6, pp. 613-643 (in Russian).
3. Kopylov A.T., Zgoda V.G., Archakov A.I. Kolichestvennyi mass-spektrometricheskii analiz sodержaniia belkov v biologicheskikh probakh bez ispol'zovaniia izotopnykh metok [Quantitative mass spectrometric analysis of protein content in biological samples without the use of isotopic tags]. *Biomeditsinskaya khimiia [Biomedical Chemistry]*, 2009, vol. 55, no. 2, pp. 125-139 (in Russian).
4. Zav'yalova M.G. Zgoda V.G., Kharybin O.N., Ye.N. Nikolayev Ye.N. Poluchenie peptidnogo standarta dlia srm metoda s pomoshch'iu fosforilirovaniia *in vitro* [Preparation of a peptide standard for the srm method using *in vitro* phosphorylation]. *Biomeditsinskaya khimiia [Biomedical Chemistry]*, 2014, vol. 60, pp. 668-676 (in Russian).
5. Sentandreu M. A., Fraser, P. D., Halket, J., Patel, R., & Bramley, P. M. A proteomic based approach for detection of chicken in meat mixes. *Journal of Proteome Research*, 2010, vol. 9, pp. 3374–3383. doi: 10.1021/pr9008942
6. Montowska M., & Fornal, E. Label-free quantification of meat proteins for evaluation of species composition of processed meat products. *Food Chem.*, 2017, vol. 237, no. 15, pp. 1092–1100. doi:10.1016/j.foodchem.2017.06.059.
7. Naveena B. M., Jagadeesh, D. S., Babu, A. J., Rao, T. M., Kamuni, V., Vaithyanathan, S., et al. OFFGEL electrophoresis and tandem mass spectrometry approach compared with DNA-based PCR method for authentication of meat species from raw and cook ground meat mixtures containing cattle meat, water buffalo meat and sheep meat. *Food Chem.*, 2017, vol. 233, pp. 311-320. doi:10.1016/j.foodchem.2017.04.116.
8. Grundy H. H., Reece, P., Buckley, M., Solazzo, C. M., Dowle, A. A., Ashford, D., et al. A mass spectrometry method for the determination of the species of origin of gelatine in foods and pharmaceutical products. *Food Chem.*, 2016, vol. 190, pp. 276-284. doi:10.1016/j.foodchem.2015.05.054
9. Skyline software. Available at: <https://skyline.ms/project/home/software/Skyline/begin.view> (accessed 11 March 2019)
10. Watson A. D., Gunning, Y., Rigby, N. M., Philo, M., & Kemsley, E. K. Meat authentication via multiple reaction monitoring mass spectrometry of myoglobin peptides. *Anal. Chem.*, 2015, vol. 87, pp. 10315–10322. doi:10.1021/acs.analchem.5b02318
11. BLAST software. Available at: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome (accessed 11 March 2019).
12. Vostrikova N.L. Chernukha I.M. Identification of Tissue-Specific Proteins and Peptides Forming Innovative Meat Products Corrective Properties to Confirm Authenticity of Meat Raw Materials. *Foods and Raw Materials*, 2018, vol. 6, no. 1, pp. 201-209. doi: 10.21603/2308-4057-2018-1-201-209
13. Vostrikova N.L., Chernukha I.M., Khvostov D.V. Methodological aspects of identification of tissue-specific proteins and peptides forming the corrective properties of innovative meat products. *Theory and practice of meat processing*, 2018, vol. 3, no. 3, pp. 36-55. doi: 10.21323/2414-438X-2018-3-3-36-55