

# UPLC-MS/MS法检测3种食品中松仁过敏原

宁亚维<sup>1</sup>, 周泓鑫<sup>1</sup>, 杨正<sup>1</sup>, 马俊美<sup>2</sup>, 刘茁<sup>1</sup>, 张岩<sup>2</sup>, 李强<sup>2,\*</sup>

(1.河北科技大学食品与生物学院, 河北石家庄 050018; 2.河北省食品检验研究院, 河北石家庄 050000)

**摘要:** 基于食品基质中松仁过敏原Pin k 2建立了一种超高效液相色谱-串联质谱法。将松仁经过研磨、脱脂、浸提、酶解后经Easy-nLC 1000-QExecutive高分辨质谱仪进行分离分析, 结合Uniprot蛋白数据库以及ProteinPilot™软件对质谱图进行数据处理, 经BLAST验证特异性, 最终筛选3条松仁特异性肽段。方法学验证结果表明, 方法在0.001~50 mg/mL范围内线性关系良好, 定量限为1 mg/kg; 在饼干、巧克力和饮料3种空白基质中的平均回收率为88.50%~107.57%, 相对标准偏差不高于6.08%, 基质效应为89.77%~96.13%。该方法具有灵敏度高、特异性好的优势, 可应用于饼干、巧克力、饮料等食品样品中松仁过敏原的检测, 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。

**关键词:** 松仁; 过敏原; 超高效液相色谱-串联质谱法; 检测

## Detection of Pine Nut Allergen in Three Kinds of Food by Ultra-high Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

NING Yawei<sup>1</sup>, ZHOU Hongxin<sup>1</sup>, YANG Zheng<sup>1</sup>, MA Junmei<sup>2</sup>, LIU Zhuo<sup>1</sup>, ZHANG Yan<sup>2</sup>, LI Qiang<sup>2,\*</sup>

(1. College of Food and Biology, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China;

2. Hebei Food Inspection and Research Institute, Shijiazhuang 050000, China)

**Abstract:** An ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method was established for the detection of pine nut allergen Pin k 2 in food matrices. Pine nuts were ground, degreased, and enzymatically extracted and the hydrolysate was separated and analyzed by using an Easy-nLC 1000-QExecutive high-resolution mass spectrometer, and the mass spectral data obtained were processed using Protein Pilot™ software and the Uniprot protein database. The specificity was verified by Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), and three pine nut-specific peptides were selected finally. The developed method exhibited a good linear relationship in the concentration range of 0.001–50 mg/mL, and the limit of quantification was 1 mg/kg. The average recoveries for blank biscuit, chocolate and beverage were 88.50%–107.57%, with a relative standard deviation (RSD) not exceeding 6.08%, and the matrix effect was 89.77%–96.13%. This method has the advantages of high sensitivity and good specificity, and can be applied to the detection of pine nut allergens in food samples such as biscuits, chocolate, and beverages, which provides technical support for the authentication of food labels and the detection of latent allergens in foods.

**Keywords:** pine nut; allergen; ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method; detection

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230118-140

中图分类号: TS201

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2024)01-0247-07

引文格式:

宁亚维, 周泓鑫, 杨正, 等. UPLC-MS/MS法检测3种食品中松仁过敏原[J]. 食品科学, 2024, 45(1): 247-253.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230118-140. <http://www.spkx.net.cn>

NING Yawei, ZHOU Hongxin, YANG Zheng, et al. Detection of pine nut allergen in three kinds of food by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Science, 2024, 45(1): 247-253. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230118-140. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2023-01-18

基金项目: 河北省青年拔尖人才项目; 河北省自然科学基金面上项目(C2022208003)

第一作者简介: 宁亚维(1983—)(ORCID: 0000-0003-1128-6940), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品生物技术与食品安全。

E-mail: ningyw@hebust.edu.cn

\*通信作者简介: 李强(1981—)(ORCID: 0000-0001-5744-1403), 男, 正高级工程师, 硕士, 研究方向为食品安全。

E-mail: sjzliq@163.com

近年来,食物过敏性疾病在世界范围内的发生率呈现上升趋势,已经成为一个公众性、全球性的健康问题<sup>[1]</sup>。松仁属于八大类食物过敏原中的坚果类,坚果是致命性过敏反应的最常见原因之一,常常引发患者出现荨麻疹、恶心及味觉改变,严重时会出现急性哮喘、过敏性休克<sup>[2-4]</sup>等过敏性症状,患者即使接触微量松仁也会引起过敏性疾病<sup>[5]</sup>。由于现阶段对于松仁过敏尚无有效治疗手段,过敏人群只能依赖食品标签识别避免日常饮食中出现松仁。然而松仁营养素种类丰富,常作为食品原料增加产品营养价值<sup>[6]</sup>。在食品生产过程中,含松仁的食品与其他食品共用生产线,可能导致交叉污染,但此类隐性过敏原是导致过敏的主要原因。此外,生产过程中包装错误与原料处理不当等原因也增加了松仁过敏患者的患病风险<sup>[7-8]</sup>。因此,需要开发一种高灵敏检测技术对食品中的松仁过敏原进行有效监管。

目前,食品中过敏原的检测技术主要包括基于DNA水平的检测技术和基于蛋白质水平的检测技术两大类。基于DNA水平检测技术有聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)<sup>[9-10]</sup>、实时PCR(real-time PCR)<sup>[11]</sup>以及环介导等温扩增技术<sup>[12]</sup>;基于蛋白质水平的检测技术,有酶联免疫吸附技术(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)<sup>[13-14]</sup>、免疫印迹技术<sup>[15]</sup>以及液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)法<sup>[16-19]</sup>。目前我国针对食品中松仁过敏原检测的研究较少。国外报道, Garino等<sup>[20]</sup>通过real-time PCR对复杂食品中松子过敏原进行特异性检测。这类基于DNA水平的检测技术原理是检测食品中是否存在过敏原蛋白基因检测过敏原,但检测过程是针对编码目的蛋白的基因序列,因此无法直接判断过敏原是否存在,并且容易出现假阳性现象<sup>[21]</sup>。Cabanillas等<sup>[21]</sup>通过ELISA提取了松子中的致敏蛋白Pin p 1,松子过敏原Pin p 1与裸子植物的2S白蛋白具有高度同源性,与被子植物的2S白蛋白具有低同源性,表明松子致敏蛋白Pin p 1特异性较低,因此会影响食品中松子过敏原的检测准确度。ELISA是目前应用最广泛的基于蛋白质水平的过敏原检测技术,具有灵敏性高、特异性强等优点。但ELISA只能检测一种致敏性蛋白质,并且若加工过程中出现蛋白质变性则会导致抗体无法识别从而出现假阳性结果。因此,有必要开发一种基于食品中松仁过敏原的高效、准确的快速检测技术。

质谱技术具有高通量、高分辨率、高灵敏度等优点,不仅可以避免加工过程中蛋白质变性而引起的假阳性结果,而且可以避免同源性蛋白质导致的假阳性问题,在食品中过敏原的定量检测方面具有较高的优势。Sealey-Voyksner等<sup>[22]</sup>采用LC-MS/MS方法基于松仁过敏原pin 1和pin 2筛选了TLAQLDVELETAR和

DYSSFPLAGPASSGGGGR两条特征肽段,实现了定性检测,但未开发高灵敏度定量检测技术。Lee等<sup>[23]</sup>基于松仁过敏原以ALPNFGEVSELLEGISR为定量肽段建立了一种LC-MS/MS法检测饼干中的坚果过敏原,其中松仁过敏原检出限为10 mg/kg,方法检出限相对较高。因此,有必要基于LC-MS/MS方法筛查高特异性特征肽段,开发高灵敏度松仁过敏原检测技术。鉴于上述研究背景,本研究拟筛选松仁特异性肽段,建立一种UPLC-MS/MS对常见食品基质中的松仁过敏原Pin k 2进行快速检测,以期对食品中松仁过敏原进行高灵敏度检测,为我国食品标签真实性检验及食品中松仁隐性过敏原的检测提供技术支持。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

松仁、饼干、饮料、巧克力等食品随机购买于河北石家庄。

三羟甲基氨基甲烷、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、碘乙酰胺(iodoacetamide, IAA)、碳酸氢铵、氯化钙(均为分析纯) 美国Sigma-Aldrich公司;尿素(分析纯) 上海阿拉丁生化科技股份有限公司;生物级TPCK-胰蛋白酶 美国SCIEX公司;正己烷、乙腈(均为质谱级) 美国Fisher Scientific公司;甲酸(色谱纯) 天津科密欧化学试剂有限公司;所有试剂均使用Watsons蒸馏水配制。

### 1.2 仪器与设备

Easy-nLC 1000-Q-Exactive LCQ液相色谱-串联高分辨质谱、超速离心管(10 kDa) 美国Thermo Scientific公司;Qtrap 5500超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱仪 美国AB SCIEX公司;1-14K高速冷冻离心机 美国Sigma公司;ULTA-TURRAX分散机、Trayster digital涡旋混匀器 德国IKA公司;SHA-B恒温振荡水浴锅等 常州润华电器有限公司;离心管 德国Eppendorf公司;低蛋白吸附样品瓶(250  $\mu$ L) 美国Waters公司;Protonavi(2.0 mm $\times$ 150 mm, 5  $\mu$ m)色谱柱 日本资生堂投资有限公司;C<sub>18</sub>富集柱(100  $\mu$ m $\times$ 4 cm, 5  $\mu$ m, 120  $\text{\AA}$ )、C<sub>18</sub>分析柱(75  $\mu$ m $\times$ 15 cm, 5  $\mu$ m, 120  $\text{\AA}$ ) 北京乐润峰科技有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 标准储备液的制备

取5 g松仁,加入50 mL水,使用豆浆机磨浆5 min,直至松仁颗粒完全溶解。将溶液转移至100 mL容量瓶中,加水定容,配制成50 mg/mL的松仁标准储备液,4  $^{\circ}$ C保存备用。

### 1.3.2 样品前处理

称取1 g经过研磨的样品, 加入5 mL正己烷脱脂, 旋转混匀15 min, 4 000×g离心15 min, 重复脱脂操作两次, 脱脂后的样品用氮气吹干。后加入4 mL提取缓冲液(含2 mol/L尿素的50 mmol/L Tris溶液), 混匀后旋转振荡提取1 h, 6 000×g离心20 min。移取500 μL上清液至2 mL离心管中, 加入10 μL还原剂(500 mmol/L DTT), 混匀后置于60 °C水浴锅, 振荡反应30 min。将混合物冷却至室温后加入30 μL烷基化试剂(500 mmol/L IAA), 混匀后暗处反应30 min。加入420 μL的酶解缓冲液(500 mmol/L的碳酸氢铵溶液和1 mmol/L的氯化钙溶液)和30 μL的胰蛋白酶(500 μg/mL)溶液, 充分混匀后置于37 °C水浴锅孵育过夜。加入10 μL甲酸停止酶解反应, 将混合物室温静置5 min后于12 000×g离心8 min, 取上清液至10 kDa超滤离心管中, 14 400×g离心20 min。收集下层滤液利用高效液相色谱-串联质谱进行分析。

### 1.3.3 仪器条件

#### 1.3.3.1 液相色谱-串联高分辨质谱测定条件

色谱条件: 预柱: C<sub>18</sub>富集柱(100 μm×4 cm, 5 μm, 120 Å); 分析柱: C<sub>18</sub>分析柱(75 μm×15 cm, 5 μm, 120 Å); 进样体积2 μL; 流动相A为0.1%甲酸溶液, 流动相B为0.1%甲酸-乙腈溶液; 洗脱程序: 0~3 min, 97%~93% A、3%~7% B; 3~38 min, 93%~78% A、7%~22% B; 38~48 min, 78%~65% A、22%~35% B; 48~50 min, 65%~10% A、35%~90% B; 50~60 min, 10% A、90% B; 流速300 nL/min。

质谱条件: 配备蛋白专用Nanospray Flex电离源, 采用正离子模式; 扫描模式为Full MS/dd-MS<sup>2</sup>; Full MS分辨率70 000; 自动增益控制目标1×10<sup>6</sup>; 扫描范围 $m/z$  350~1 800; dd-MS<sup>2</sup>分辨率17 500; 自动增益控制目标1×10<sup>5</sup>; 隔离窗口 $m/z$  2.0; 第一固定质量 $m/z$  120.0; 碰撞能量27 eV。

#### 1.3.3.2 超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱测定条件

色谱条件: 采用色谱柱Proteonavi(2.0 mm×150 mm, 5 μm); 流动相A: 0.1%甲酸溶液, 流动相B: 0.1%甲酸-乙腈溶液; 洗脱程序: 0~2 min, 90% A、10% B; 2~4 min, 90%~70% A、10%~30% B; 4~7.5 min, 70%~60% A、30%~40% B; 7.5~9 min, 60%~25% A、40%~75% B; 9~11 min, 25% A、75% B; 11~11.01 min, 25%~90% A、75%~10% B; 11.01~15 min, 90% A、10% B; 流速300 μL/min; 进样体积2 μL。

质谱条件: 采用电喷雾电离源; 正离子扫描模式; 采用多反应监测模式; 离子化电压4 000 V; 雾化气压力

55 psi; 辅助气压力55 psi; 气帘气压力30 psi; 离子源温度450 °C。

### 1.3.4 方法学验证

#### 1.3.4.1 线性关系、检出限、定量限

使用空白基质提取液将松仁标准储备液(50 mg/mL)稀释至质量浓度为0.001、0.002、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50 mg/mL的溶液。取500 μL上述溶液至2 mL离心管中, 经1.3.2节所述的还原、烷基化和酶解后得到酶解液。向酶解液中加入10 μL甲酸停止消化, 然后12 000×g离心8 min, 取上清液过0.22 μm的羧甲基纤维素滤膜, 收集滤液进行UPLC-MS/MS分析。

线性方程以松仁质量浓度为横坐标( $X$ ), 松仁特征肽段的色谱峰面积作为纵坐标( $Y$ )进行计算(4个平行)。分别以特征肽段获得3倍和10倍信噪比时的松仁质量浓度作为检出限和定量限。

#### 1.3.4.2 加标回收率

分别向空白基质中添加2、4、20倍定量限的松仁标准品储备液, 进行加标回收率的测定, 每个浓度设置6个平行以计算方法精密度。为排除基质对松仁特征肽段定量的影响, 所有标准曲线均使用该基质所对应的不含松仁的空白样品提取液进行配制。

#### 1.3.4.3 基质效应

精密移取一定量的松仁标准储备液, 用不含松仁的饼干、巧克力和饮料空白基质提取液梯度稀释配成0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50 mg/mL的标准曲线溶液用于计算基质效应。基质效应按下式计算:

$$\text{基质效应}/\% = \frac{\text{slope}_{\text{matrix}}}{\text{slope}_{\text{standard}}} \times 100$$

式中:  $\text{slope}_{\text{matrix}}$ 为空白基质标准曲线的斜率;  $\text{slope}_{\text{standard}}$ 为水溶剂标准曲线的斜率。

### 1.3.5 实际样品检测

固体样品研磨为粉末后称取1 g, 移取液体样品500 μL, 将上述样品按照1.3.2节方法进行前处理后, 用标准曲线对样品中的松仁含量进行定量。

## 1.4 数据统计及图表绘制

所有实验均重复3次取其平均值, 通过Origin软件对数据进行统计分析并对实验结果进行作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 特征肽段的筛选

特征肽段对液相色谱-质谱检测方法的特异性和灵敏度具有重要影响。松仁过敏原Pin k 2属于豌豆球蛋白, 具有较好的热稳定性<sup>[24]</sup>, 在食品加工过程中不易降解<sup>[25-26]</sup>。因此本研究针对松仁主要过敏原Pin k 2

进行特征肽段筛选。将经过酶解净化后的样品使用 Easy-nLC 1000-Q-Exactive LCQ液相色谱-串联高分辨质谱仪进行分离分析, 随后结合Uniprot蛋白数据库以及ProteinPilot™软件对得到的质谱谱图进行数据处理, 得到大量的肽段信息(图1)。然后按照以下的肽段筛选原则进行特征肽段的筛选: 首先是对肽段长度的要求, 应为8~25个氨基酸为宜, 肽段过短难以满足特异性要求, 过长则容易在前处理过程中断裂; 其次, 所选肽段不应含修饰位点, 也不应漏切和错切的酶切位点, 以保证方法的重复性; 经BLAST搜索后具有特异性, 以免在其他物种中被检测到, 出现假阳性结果; 在进行定性和定量分析时, 具有较高的灵敏度和良好的峰形<sup>[27-30]</sup>。根据以上筛选原则, 最终筛选了3条符合条件的松仁特异性肽段, 分别为ALPNFGEVSELLEGISR、LEILWFDINTSGNER、NNVLQTLEK。其中NNVLQTLEK肽段为本实验中首次筛选到的特异性肽段。松仁过敏原与花生过敏原Ara h 3有重合的线性表位<sup>[31]</sup>, 为了保证所筛选的肽段具有特异性, 制备了花生、杏仁、核桃、芝麻、葵花籽、开心果和榛子等常见坚果的酶解样品验证松仁肽段特异性, 结果显示, 所筛选的3条松仁肽段均只在松仁酶解样品中检测到, 而其他坚果酶解样品均显示未检出。说明所筛选肽段具有高度特异性, 可用于松仁过敏原检测方法的开发。

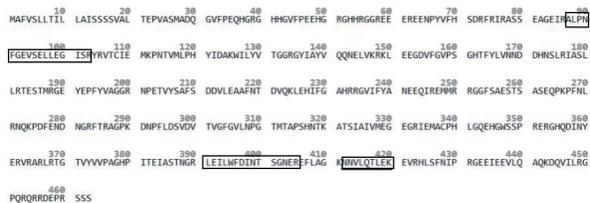


图1 Pin k 2的氨基酸序列

Fig. 1 Amino acid sequences of Pin k 2

## 2.2 流动相及质谱参数的优化

在相同的梯度洗脱程序条件下, 对比100%水、0.1%甲酸-水和100%乙腈、0.1%甲酸-乙腈分别作为流动相A和流动相B时特征肽段的响应值和峰形。结果表明, 以0.1%甲酸-水和0.1%甲酸-乙腈分别作为流动相A和流动相B, 特征肽段的响应值和峰形都更好, 明显改善了拖尾现象, 且肽段的稳定性较高。加入甲酸可以在一定程度上促进肽类物质的电离, 从而增强其质谱信号, 因此后续研究采用0.1%甲酸-水和0.1%甲酸-乙腈分别作为流动相A和流动相B。

通过ProteinPilot™得到的数据信息中可以得到特异性肽段的母离子和b、y离子参数, 选取响应值较高的b、y离子作为子离子。制备高浓度的松仁酶解样品, 通过蠕动泵以5  $\mu\text{L}/\text{min}$ 的速率直接注入Qtrap 5500质谱仪中, 以全扫描模式依次确定肽段的精确母离子、子离子以及其他质谱参数, 为保证检测结果的准确度, 每个肽段选取

3个子离子。优化后的去簇电压、碰撞能量参数见表1, 优化后的色谱图见图2。

表1 松仁特征肽段的MRM参数

Table 1 MRM parameters of characteristic peptides from pine nuts

过敏原	Uniprot索引名称	肽段	m/z		去簇电压/V	碰撞能量/eV
			母离子	子离子		
Pin k 2	V9VGU0	ALPNFGEVSELLEGISR	915.98	823.92*	92.9	40.5
				175.12		47.5
				1003.54		45.2
		LEILWFDINTSGNER	903.95	243.11*	92.2	42
				356.22		42
				1152.53		25.2
				229.09*		25.4
		NNVLQTLEK	529.80	490.29	80.0	25.4
				618.35		25.6

注: \*.定量离子。

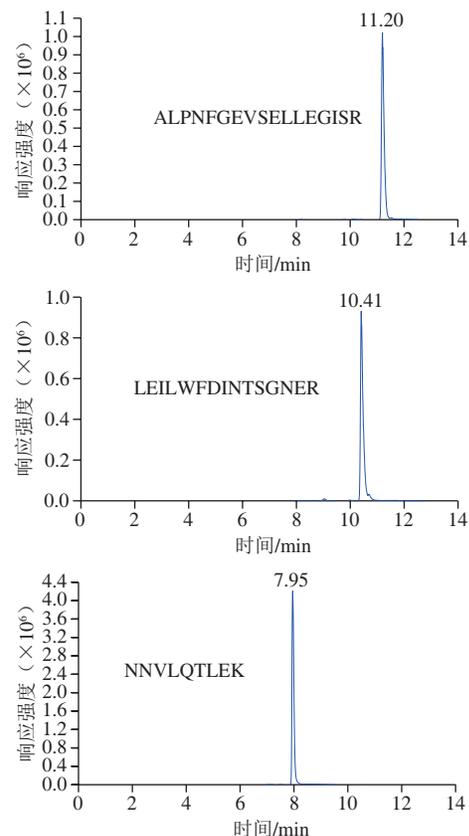


图2 松仁3条特征肽段色谱图

Fig. 2 Chromatograms of three characteristic peptides from pine nuts

## 2.3 方法学验证结果

### 2.3.1 线性关系、检出限、定量限

通过对方法线性关系、检出限和定量限的测定考察方法的灵敏度和适用的浓度范围。3条特征肽段的线性关系、检出限和定量限结果见表2。3条特征肽段在饼干、巧克力和饮料3种基质中的线性良好,  $R^2$ 均能达到0.99以上。其中NNVLQTLEK在3条特征肽段中灵敏度最高且稳定性好, 故选取NNVLQTLEK作为松仁定量分

析肽段, 其他两条肽段作为辅助定性肽段。在饼干和巧克力这两种固体基质中, 检出限、定量限分别为1 mg/kg和2.5 mg/kg; 在饮料基质中, 检出限、定量限分别为0.005 mg/mL和0.01 mg/mL。目前对于松仁过敏原检测的研究报道较少, Lee等<sup>[23]</sup>以ALPNFGEVSELLEGISR为定量肽段建立的LC-MS/MS法检测饼干中的坚果过敏原, 其中松仁过敏原检出限为10 mg/kg。而本研究中筛选到的NNVLQTLEK肽段, 检出限(1 mg/kg)仅为该方法的十分之一, 表明本方法可实现松仁过敏原的高灵敏度检测。

表2 松仁3条特征肽段的线性关系、检出限和定量限(n=4)

Table 2 Linear relationships, detection limits and quantification limits of three characteristic peptides in pine nuts (n=4)

肽段	线性范围/(mg/mL)	基质	标准曲线	R <sup>2</sup>	检出限	定量限
ALPNFGEVSELLEGISR	0.002~50	饼干	$Y=1.14871 \times 10^5 X - 2.62859 \times 10^4$	0.99574	2 mg/kg	5 mg/kg
		巧克力	$Y=7.50315 \times 10^4 X - 5246.37017$	0.99624	2 mg/kg	5 mg/kg
	0.01~50	饮料	$Y=1.23940 \times 10^5 X - 1.07397 \times 10^4$	0.99249	0.005 mg/mL	0.01 mg/mL
LEILWFDINTSGNER	0.002~50	饼干	$Y=1.73753 \times 10^5 X - 9962.02263$	0.99562	2 mg/kg	5 mg/kg
		巧克力	$Y=6.28966 \times 10^4 X - 1042.15490$	0.99862	2 mg/kg	5 mg/kg
	0.01~50	饮料	$Y=6.77363 \times 10^4 X - 1710.98382$	0.99874	0.005 mg/mL	0.01 mg/mL
NNVLQTLEK	0.001~50	饼干	$Y=3.99912 \times 10^5 X + 155717 \times 10^5$	0.99950	1 mg/kg	2.5 mg/kg
		巧克力	$Y=3.19418 \times 10^5 X + 2.81300 \times 10^4$	0.99539	1 mg/kg	2.5 mg/kg
	0.005~50	饮料	$Y=7.39559 \times 10^5 X + 4.58347 \times 10^4$	0.99964	0.002 mg/mL	0.005 mg/mL

### 2.3.2 加标回收实验结果

为考察方法的重复性和稳定性, 在空白基质中添加松仁标准储备液进行加标回收率和精密度的测定。松仁在饼干、巧克力和饮料3种空白基质中的加标回收率如表3、4所示, 在饼干基质中的回收率在88.50%~107.57%之间, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为0.94%~4.21%; 在巧克力基质中的回收率在96.60%~104.57%之间, RSD为2.22%~6.08%; 在饮料基质中的回收率在87.42%~108.20%之间, RSD在1.79%~4.89%之间。上述结果表明, 此方法具有较好的准确度且重复性好。

表3 松仁肽段饼干、巧克力基质加标回收率(n=6)

Table 3 Recoveries of pine nut peptides from spiked biscuit and chocolate (n=6)

肽段	加标量/(mg/kg)	饼干基质		巧克力基质	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
ALPNFGEVSELLEGISR	10	95.73	2.57	97.97	4.03
	20	96.74	2.13	100.74	2.22
	100	101.32	0.94	104.57	2.68
LEILWFDINTSGNER	10	90.86	3.58	103.70	3.73
	20	91.18	2.84	99.96	6.08
	100	100.08	1.64	99.90	3.79
NNVLQTLEK	5	93.64	3.74	104.55	4.18
	10	107.57	2.36	99.57	3.34
	50	88.50	4.21	96.60	3.19

表4 松仁肽段饮料基质加标回收率(n=6)

Table 4 Recoveries of pine nut peptides from beverage (n=6)

肽段	加标量/(mg/mL)	回收率/%	RSD/%
ALPNFGEVSELLEGISR	0.02	105.40	2.28
	0.04	103.00	2.10
	0.2	87.42	2.23
LEILWFDINTSGNER	0.02	93.90	3.54
	0.04	100.45	2.32
	0.2	92.09	2.14
NNVLQTLEK	0.01	108.20	4.10
	0.02	106.50	1.79
	0.1	101.38	4.89

### 2.3.3 基质效应

食品基质会在一定程度上对目标化合物起到促进或抑制作用, 为验证食品基质是否对检测方法有干扰, 对定量肽段NNVLQTLEK的基质效应进行检测。定量肽段NNVLQTLEK的基质效应如图3所示, 结果表明饼干的基质效应为89.77%, 巧克力的基质效应为91.82%, 饮料的基质效应为96.13%, 结果均小于100%, 说明饼干、巧克力、饮料对特征肽段均有不同程度的抑制作用, 因此, 后续研究均采用基质配标定量以补偿基质效应。

水:  $Y=5.28510 \times 10^5 X + 4.14375 \times 10^4$  ( $R^2=0.9850$ );  
 饼干:  $Y=4.74455 \times 10^5 X + 3.94923 \times 10^4$  ( $R^2=0.9829$ );  
 巧克力:  $Y=4.85286 \times 10^5 X + 3.40184 \times 10^4$  ( $R^2=0.9893$ );  
 饮料:  $Y=5.08075 \times 10^5 X + 5.35166 \times 10^4$  ( $R^2=0.9841$ )。

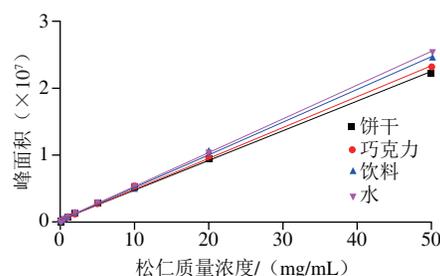


图3 肽段NNVLQTLEK水溶液与相应空白基质配制的标准曲线

Fig. 3 Standard curves of aqueous solution of peptide NNVLQTLEK and blank matrices spiked with peptide NNVLQTLEK

### 2.4 实际样品检测结果

为了检验方法的适用性, 自当地市场随机购买了饮料、饼干和巧克力等样品, 利用所建立方法对其中的松仁含量进行定量, 检测结果如表5所示。10个饼干样品中, 有3个样品(分别为饼干-7、饼干-8以及饼干-9样品)明确标注含有松仁成分, 检测结果显示样品中均检出松仁成分, 含量范围为(0.088±0.005)~(97.972±0.455) g/kg。其余7个饼干样品、6个饮料样品和6个巧克力样品对于过敏原信息的标注均为“可能含有坚果”, 但并未写明具体所含坚果的种类, 检测结果显示均未检测出松仁。上述结果表

明此方法可以应用于食品标签准确性的验证,同时可以筛查未明确标注松仁过敏原的食品中是否含有松仁成分。

表5 市售样品中松仁含量

Table 5 Pine nut contents in commercially available samples

样品	过敏原信息标注	松仁含量/(g/kg)
饮料-1	可能含有坚果	ND
饮料-2	可能含有坚果	ND
饮料-3	可能含有坚果	ND
饮料-4	可能含有坚果	ND
饮料-5	可能含有坚果	ND
饮料-6	可能含有坚果	ND
巧克力-1	生产线还含有坚果果仁	ND
巧克力-2	可能含有微量坚果果仁成分	ND
巧克力-3	可能含有微量坚果果仁成分	ND
巧克力-4	可能含有微量坚果果仁成分	ND
巧克力-5	可能含有坚果果仁	ND
巧克力-6	可能含有坚果果仁	ND
饼干-1	生产线加工含有坚果的产品	ND
饼干-2	还可能含有微量的坚果	ND
饼干-3	生产线加工含有坚果的产品	ND
饼干-4	生产线加工含有坚果的产品	ND
饼干-5	还可能含有微量的坚果	ND
饼干-6	可能含有果仁制品	ND
饼干-7	无标注,但配料表含有松仁	0.088±0.005
饼干-8	无标注,但配料表含有松仁	0.350±0.009
饼干-9	含有松仁	97.972±0.455
饼干-10	无标注	ND

注:ND.未检出。

### 3 结论

本研究开发了一种UPLC-MS/MS检测食品中松仁过敏原Pin k 2的方法。通过蛋白质组学与高分辨质谱结合成功筛选到3条松仁特征肽段,进一步采用三重四极杆质谱的多反应监测模式建立了食品松仁过敏原快速检测方法。该方法具有灵敏度高、特异性好等优势,可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。

### 参考文献:

- [1] 张爱琳,段筱筠,王效坤,等.主要坚果类过敏原致敏机理的初步探讨[J].现代食品科技,2016,32(11):22-28. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.11.004.
- [2] 候艳丽,周佳悦,王凡宇,等.坚果中主要过敏原种类、检测及脱敏技术研究进展[J].食品工业科技,2023,44(3):421-431. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2022020195.
- [3] KHUDA S, SLATE A, PEREIRA M, et al. Effect of processing on recovery and variability associated with immune chemical analytical methods for multiple allergens in a single matrix: sugar cookies[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(17): 4195-4203. DOI:10.1021/jf3001839.
- [4] 宋天园,王甜,肖兰,等.植物蛋白过敏原的研究进展[J].饲料博览,2022(5):29-37;46. DOI:10.20041/j.cnki.slbl.2022.05.005.
- [5] CABANILLAS B, CRESPO J F, MALEKI S J, et al. Pin p 1 is a major allergen in pine nut and the first food allergen described in the plant group of gymnosperms[J]. Food Chemistry, 2016, 210: 70-77. DOI:10.1016/j.foodchem.2016.04.068.
- [6] 周晓.论食品企业中的过敏原控制[J].科技视界,2019(14):80-81. DOI:10.19694/j.cnki.issn2095-2457.2019.14.037.
- [7] GARCÍA-MENAYA J M, GONZALO-GARIJO M A, MONEO I, et al. A 17-kDa allergen detected in pine nuts[J]. Allergy, 2000, 55(3): 291-293. DOI:10.1034/J.1398-9995.2000.00291.X.
- [8] LU W, NEGI S S, SCHEIN C H, et al. Distinguishing allergens from non-allergenic homologues using physical-chemical property (PCP) motifs[J]. Molecular Immunology, 2018, 99: 1-8. DOI:10.1016/J.MOLIMM.2018.03.022.
- [9] 王玮,韩建勋,袁飞,等.多重PCR同时检测常见8种食物过敏原[J].中国食品学报,2011,11(6):152-157. DOI:10.16429/j.1009-7848.2011.06.031.
- [10] 金萍,丁洪流,张敏,等.双重实时荧光PCR法测定食品中大豆、小麦过敏原[J].食品与机械,2022,38(9):59-63;102. DOI:10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.90116.
- [11] 许银叶,苏少霖,许佩勤,等.实时荧光PCR法测定婴幼儿辅助食品中过敏原鱼类成分[J].食品安全质量检测学报,2020,11(8):2493-2497. DOI:10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.2020.08.026.
- [12] 王晶,杨彤,王芳,等.环介导等温扩增技术在食品过敏原检测中的应用[J].食品科技,2022,47(11):249-254. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2022.11.033.
- [13] 彭澜兰,朱永智,李靖,等.食物过敏原酶联免疫检测技术研究进展[J].食品工业,2022,43(3):213-217.
- [14] 梁玉博.食品检测中酶联免疫吸附试验的应用[J].品牌与标准化,2020(2):38-40.
- [15] CHEN J J, XIA L X, WU X L, et al. A practical test system for sensitive, rapid screening and authentication of peanut allergens in imported and exported food products in Chinese customs[J]. Food Control, 2012, 23(1): 154-158. DOI:10.1016/j.foodcont.2011.07.002.
- [16] 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: 131-40. DOI:10.1016/j.jprot.2018.11.002.
- [17] 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.
- [18] 熊丽姬,佟平,肖娜,等.基于液相色谱-质谱联用技术检测食物过敏原研究进展[J].食品科学,2014,35(21):274-278. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201421054.
- [19] 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.
- [20] GARINO C, DE PAOLIS A, COÏSSON J D, et al. Sensitive and specific detection of pine nut (*Pinus* spp.) by real-time PCR in complex food products[J]. Food Chemistry, 2016, 194: 980-985. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.08.114.
- [21] 杨阳,何欣蓉,何少贵,等.食品中过敏原及其检测方法的研究进展[J].食品安全质量检测学报,2021,12(14):5497-5506. DOI:10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.2021.14.001.
- [22] SEALEY-VOYKSNER J, ZWEIGENBAUM J, VOYKSNER R. Discovery of highly conserved unique peanut and tree nut peptides by

- LC-MS/MS for multi-allergen detection[J]. Food Chemistry, 2016, 194: 201-211. DOI:10.1016/J.FOODCHEM.2015.07.043.
- [23] LEE S N, LIU H F, JIANRU S Z, et al. Simultaneous analysis of multiple allergens in food products by LC-MS/MS[J]. Journal of AOAC International, 2018, 101(1): 132-145. DOI:10.5740/jaoacint.17-0403.
- [24] ZHANG Y, DU W X, FAN Y, et al. Identification, characterization, and initial epitope mapping of pine nut allergen pin k 2[J]. Food Research International, 2016, 90: 268-274. DOI:10.1016/j.foodres.2016.10.043.
- [25] 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.jprot.2018.11.002.
- [26] KORTE R, BROCKMEYER J. MRM<sup>3</sup>-based LC-MS multi-method for the detection and quantification of nut allergens[J]. Anal Bioanal Chemistry, 2016, 408(27): 7845-7855. DOI:10.1007/s00216-016-9888-y.
- [27] 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.
- [28] 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.jprot.2016.04.018.
- [29] KORTE R, BROCKMEYER J. Novel mass spectrometry approaches in food proteomics[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2017, 96: 99-106. DOI:10.1016/j.trac.2017.07.010.
- [30] 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.
- [31] 黄玉霞, 梁金玲, WANG L, 等. 食品中花生过敏原及其检测方法的研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, 39(22): 314-318; 327. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2018.22.055.