

# Application News

## No. C160

液相质谱联用仪

### LC-MS/MS 同时测定多种食物过敏原

食物过敏是由于对食品中特定蛋白质的过度免疫反应而引起的，现今食物过敏已成为公共卫生和食品工业中急需解决的问题。为防止意外接触过敏原（过敏物质），含有过敏原的食品必须严格按照规定贴上标签。美国食品药品监督管理局（FDA）基于“食品过敏原标识及消费者保护法案”（Food Allergen Labeling and Consumer Protection Act, FALCPA），指出了乳制品、鸡蛋、鱼类（例：鲑鱼、比目鱼、鳕鱼），甲壳类（例：螃蟹、龙虾、虾），坚果类（如杏仁、山核桃、胡桃），花生、小麦和大豆八个主要过敏原，并规定以上食物必须标明主要的过敏原。

目前，ELISA（酶联免疫吸附测定）和PCR（聚合酶链反应）作为检测方法得到了广泛应用，两种方法均可通过简便的操作检测出致敏食品原料。尽管如此，ELISA存在因交叉反应导致检测结果为假阳性的风险。而且，使用ELISA方法进行食品原料测定时需要用不同的试剂盒进行多次测定，有一定的局限性。另外一种检测方法PCR是检测DNA的方法，并不能检测蛋白质，因此难以鉴别乳制品和牛肉，且难以检测不含DNA的蛋清。基于上述原因，使用更为准确的检测方法测定过敏原愈发重要。

近年来，液相质谱联用分析法（LC/MS）因其高选择性和高灵敏度，能对多种过敏原同时分析，现今作为新型分析方法应用于食物过敏原的检测。在本报告中，我们建立了LC-MS/MS测定法对8种主要食物过敏原进行同时测定，以及加工食品在该分析方法中的应用和市售进行评估。

#### ■ 样品前处理

从市面上购买含有过敏原的食物作为样品。用研磨机（GM-200, Retsch）粉碎样品，称取0.5-1 g置于50mL离心管中。用己烷除去食物的油脂，再用含有50mM Tris-HCl（pH8.0）、2M尿素、蛋白酶抑制剂的提取溶液对蛋白质进行提取。对含有100-250 μg蛋白质的提取溶液进行还原烷基化处理，再用胰蛋白酶进行酶消化。消化完毕的多肽样品通过SPE脱盐，并冷冻干燥后储存。

#### ■ LC-MS/MS 检测过敏蛋白

在分析条件的研究中，考虑到目标峰的强度和峰型，以及与其他多肽之间的同源性等因素，利用Skyline对MRM离子通道进行选择（图1）。以8种过敏食物中的13种蛋白质作为检测对象，选择了140种离子通道，测定上述蛋白质中的29种肽（表1）。如图2所示，所有的多肽均在6.5分钟内出峰，并且峰型和分离度良好。代表性多肽的标准曲线见图2。

T. Ogura

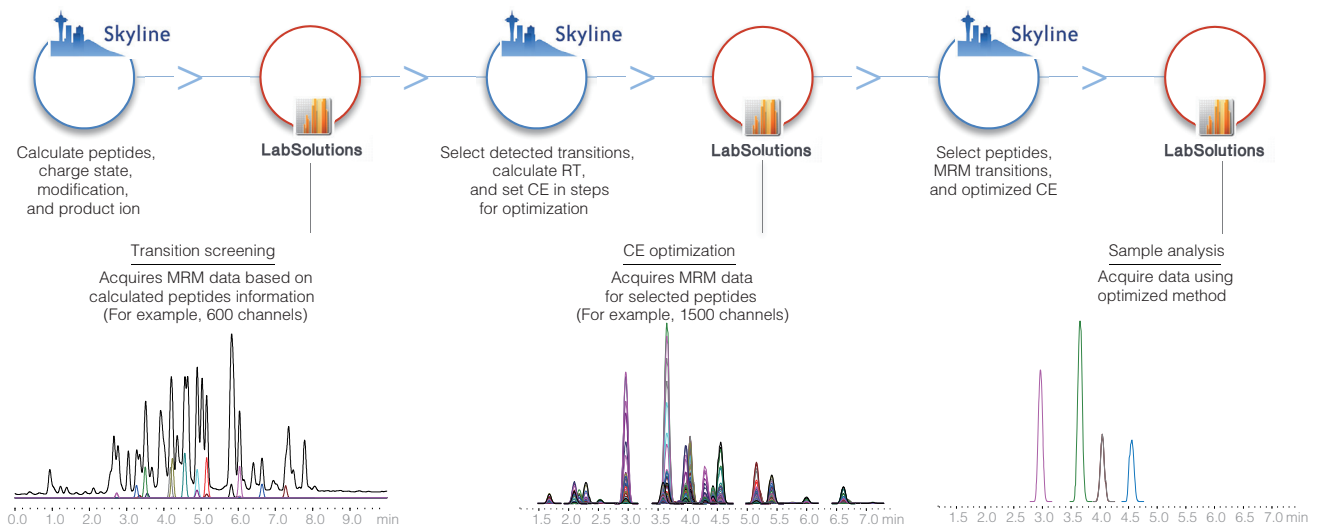


图1 Skyline 的 MRM 离子通道优化流程

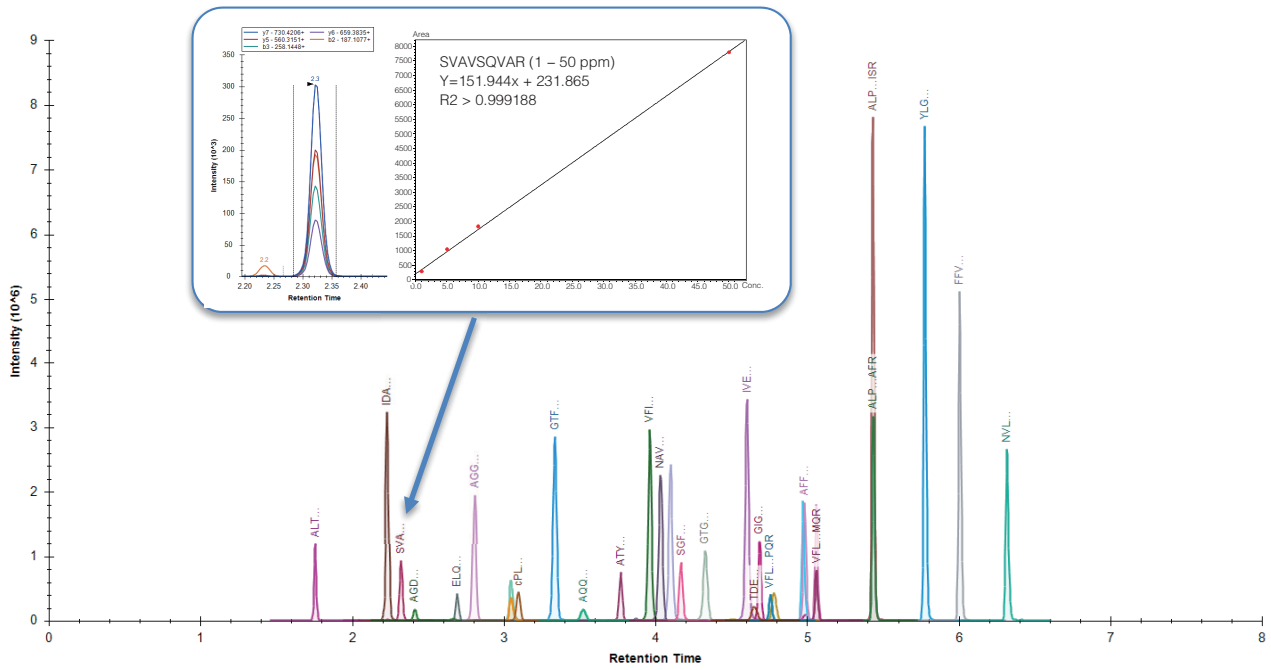


图 2 8 种过敏食物的多肽混合物色谱图和小麦中的多肽色谱图及其标准曲线

表 1 食品原料, 蛋白质名称, 肽序列以及 UniProt ID 信息表

Food (Binomial name)	Protein name (IUIS name)	Peptides	Uniprot ID
Milk ( <i>Bos taurus</i> )	Caseins (Bos d 8)	FFVAPFPEVFGK	P02662, B5B3R8
		YLGYLEQLLR	P02662, B5B3R8
		NAVPIPTLNR	P02662, B5B3R8
		FALPQYLK	P02663
	Beta-lactoglobulin (Bos d 5)	IDALNENK	P02754, G6E5H7, B5B0D4
Egg ( <i>Gallus gallus</i> )	Ovalbumin (Gal d 2)	NVLQPSSVDSQTAMVLVNAIVFK	P01012
	Ovotransferrin (Gal d 3)	ATYLDCEIK	P02789, Q4ADJ7, Q4ADJ6, E1BQC2, Q4ADG4, A0A1D5P4L7
		TDERPASYFAVAVAR	P02789, Q4ADJ7, Q4ADJ6, E1BQC2, Q4ADG4, A0A1D5P4L7, A0A1L1RSU6
Fish  Atrantic cod ( <i>Gadus morhua</i> )	Beta-parvalbumin (Gad m 1)	ALTDAETK	P02622, A5I873, Q90YL0
		AFFVIDQDK	Q90YL0, A5I873
		SGFIEDELK	Q90YL0, A5I873
Crustacean shellfish  Whiteleg shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> )	Tropomyosin (Lit v 1)	B4YAH6	B4YAH6
	Myosin, light chain 2 (Lit v 3)	EGFQLMDR	B7SNI3
		GTFDEIGR	B7SNI3
	Sarcoplasmic calcium-binding protein (Lit v 4)	VFIANQFK	C7A639
		AGGLTLER	C7A639
Tree nuts  Almonds ( <i>Prunus dulcis</i> )	Amandin, 11S globulin legumin-like protein (Pru du 6)	ALPDEVLANAYQISR	E3SH28, Q43607
		ALPDEVLQNAFR	E3SH29
Peanuts ( <i>Arachis hypogaea</i> )	Cupin Vicillin-type, 7S globulin (Ara h 1)	NNPFYFPSR	P43237, P43238, E5G076, B3IXL2, N1NG13, Q6PSU3
		GTGNLELVAVR	P43237, P43238, B3IXL2, Q6PSU6, Q6PSU3, N1NG13, Q6PSU5, E5G076, Q6PSU4
Wheat ( <i>Triticum aestivum</i> )	High molecular weight glutenin (Tri a 26)	ELQELQER	P10388, P08489 and 22 others in wheat
		SVAVSQVAR	P10387, P08488, and 21 others in wheat
		AQQPATQLPTVCR	P10387, P08488, and 21 others in wheat
	Low molecular weight glutenin GluB3-23 (Tri a 36)	VFLQQQCIPVAMQR	P10385 and 71 others in wheat
VFLQQQCSPVAMPQR		P10386, P04729, P04730 and 114 others in wheat	
Soybeans ( <i>Glycine max</i> )	Trypsin inhibitor (Gly m TI)	CPLTWQSR	P01070, P01071, P25272 and 13 others
		NKPLVQFQK	P01070, P01071, P25272 and 8 others
		NKPLVVEFOK	P25273

## 加工食品中的过敏原

市售食品的样品色谱图如图3所示，8种致敏食品原料的混合样品如图3(a)所示，7种加工食品样品如图3(b)-(h)所示。7种加工食品的标签标识和测定结果的比较见表2。结果表明，除了有大豆(Soybeans)标签的部分加工食品不用检测过敏原外，本方法能准确地检测出市售加工食品中的过敏原。

## 无麸质食物

为验证该分析方法的有效性，我们进行了无麸质食品的添加试验。美国FDA规定，“无麸质”标签的标准为面筋含量低于20ppm。我们向有“无麸质”标签的面包中添加相当于10ppm的小麦提取液，与未添加的样品测定结果进行比较(图4)。未添加小麦提取液的有“无麸质”标签的面包未检测到属于过敏原的多肽，而添加了小麦提取液的样品中检测到了多肽，由此确定该分析方法也适用于低浓度过敏原的检测。

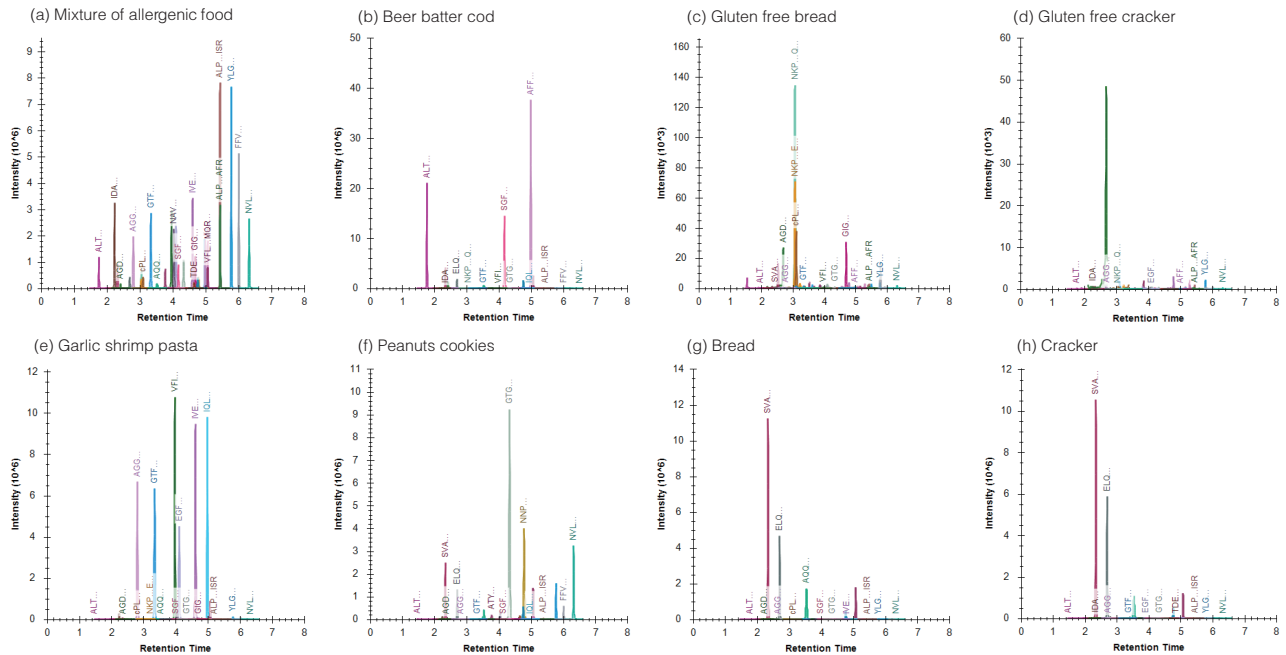


图3 致敏食品原料的混合样品(a)与7种加工食品(b)-(h)的测定结果

表2 7种加工食品的过敏原标签及测定结果

Food	Allergens	Gluten free bread		Gluten free cracker		Bread		Cracker		Peanuts cookies		Frozen fish "fried cod"		Frozen pasta "garlic shrimp"	
		Label	Detect	Label	Detect	Label	Detect	Label	Detect	Label	Detect	Label	Detect	Label	Detect
Milk	Caseins (Bos d 8) Beta-lactoglobulin (Bos d 5)			x	x					-	x	x	x	x	x
Egg	Ovalbumin (Gal d 2) Ovotransferrin (Gal d 3)			x	x	x	x			-	x				
Atrantic cod	Beta-parvalbumin (Gad m 1)									-		x	x		
Whiteleg shrimp	Tropomyosin (Lit v 1) Myosin, light chain 2 (Lit v 3) Sarcoplasmic CBP (Lit v 4)									-				x	x
Almonds	Amandin (Pru du 6)									-					x
Peanuts	Cupin, vicillin-type, 7S globulin (Ara h 1)			x						-	x				
Wheat	High molecular weight glutenin (Tri a 26) Low molecular weight glutenin (Tri a 36)					x	x	x	x	-	x	x	x	x	x
Soybeans	Trypsin inhibitor (Gly m TI)	x	x	x					x	-				x	

\* Labeled as "Crustacean shellfish (Shrimp)"

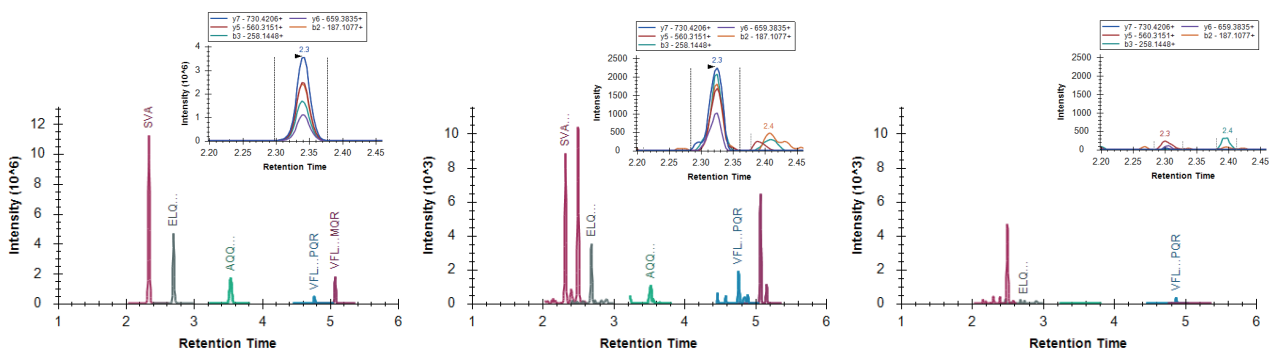


图4 普通面包(左)添加10ppm小麦提取液的“无麸质”标签面包(中)以及“无麸质”标签面包(右)色谱图

## ■ 与其他原料的同源性

在方法开发过程中，我们注意到无麸质食物与其他原材料存在同源性，因此选择对多肽进行检测。使用 UniProt 数据库检索功能，检测胰蛋白酶水解蛋白质后得到的氨基酸序列。结果显示，谷物中含有麸质相关蛋白，由此判断除小麦以外的其他谷物中同样存在部分多肽（表 3）。为防止小麦和其他谷物出现鉴别错误，我们在检测小麦中的过敏原时使用大麦、黑麦等未含有的多肽。另外，目前研究表明山羊草（goat grass）等植物中也有含有上述多肽。

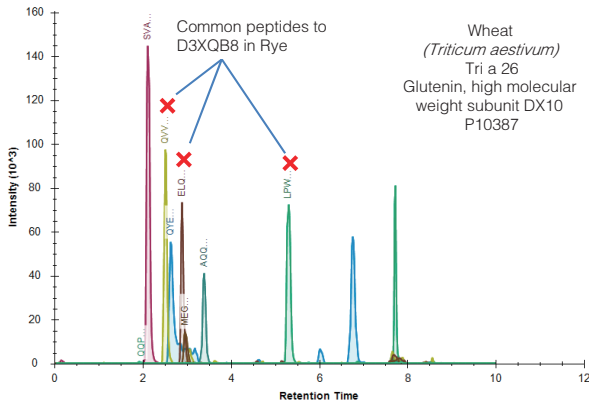


图 5 小麦粉中的多肽色谱图

## ■ 总结

- ◆ 建立 LC-MS/MS 测定主要食物过敏原的分析方法。
- ◆ 利用 140 个 MRM 离子通道对 8 种食物中的 13 种致敏蛋白（合计 29 种多肽）进行同时测定。
- ◆ 该分析方法能准确地检测市售加工食品中的过敏原。

表 3 多肽序列的检索预测结果

Analyzed wheat peptides (P10387)	Positions	Barley	Rye
AQQPATQLPTVCR	624-636		
ELQESSLEACR	33-43	x	x
LPWSTGLQMR	54-63	x	x
MEGGDALSASQ	637-647		x
QGSYYPGQASPPQPGQGQQPGK	135-156		x
QQPGQQQHPEQGGK	469-481		x
QVVDQQLAGR	44-53		x
QYEQTVPPK	86-95		
SVAVSQVAR	75-85		

x : found, blank: not found

表 4 LC/MS 分析条件

仪器	: Nexera X2 + LCMS-8050		
色谱柱	: Shimadzu Shim-pack XR-ODS III (75 mmL. × 2.0 mmI.D., 1.6 μm)		
流动相	: A : 0.1 % 甲酸水溶液, B: 乙腈		
流速	: 0.5 mL/min		
洗脱程序	: B Conc. 2 % (0 min) - 15 % (4 min) - 40 % (7 min) - 95 % (7.1 - 8 min) - 2 % (9.1 - 10 min)		
离子化模式	: ESI(+)		
DL 温度	: 150 °C	加热模块温度	: 200 °C
接口温度	: 250 °C	加热气流速	: 20 L/min
雾化气流速	: 3 L/min	干燥气流速	: 5 L/min



岛津企业管理（中国）有限公司  
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439  
400-650-0439

免责声明:

\* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;  
\* 本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。  
如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日: 2017 年 8 月