

超高效液相色谱-电喷雾质谱法检测花生 过敏原 Ara h 2

洪宇伟¹, 陈 启², 张京顺², 任一平^{1,2*}

(1. 浙江工业大学, 杭州 310014; 2. 浙江省疾病预防控制中心, 杭州 310051)

摘要: **目的** 建立烘焙食品中花生过敏原 Ara h 2 的液相质谱联用定量检测方法。**方法** 选择花生蛋白中的致敏蛋白 Ara h 2 作为目标蛋白, 筛选出该致敏蛋白的特异肽, 人工合成特异肽标准品和特异肽内标, 从而建立直接检测花生致敏蛋白 Ara h 2 的准确定量方法。同时还对全国不同地区的 20 种花生中致敏蛋白 Ara h 2 的含量进行检测分析, 初步统计得出致敏蛋白 Ara h 2 和花生蛋白的换算系数, 并以 Ara h 2 作为生物标记物检测 10 种烘焙食品中花生蛋白的残留量。**结果** 花生样品中致敏蛋白 Ara h 2 的定量限为 4.45 $\mu\text{g/g}$, 回收率在 106.0%~107.8%之间。烘焙食品中, 定量限可达到 6.23 $\mu\text{g/g}$, 回收率在 107.0%~113.2%之间。**结论** 本方法特异性强、灵敏度高、定量准确, 具有良好的应用前景。

关键词: 花生过敏原; 液相色谱-串联质谱法; Ara h 2; 特异肽

Identification and quantification of peanut allergen Ara h 2 using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

HONG Yu-Wei¹, CHEN Qi², ZHANG Jing-Shun², REN Yi-Ping^{1,2*}

(1. Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; 2. Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China)

ABSTRACT: Objective To establish a reliable ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry method to determine the peanut allergen Ara h 2 in roasted food. **Methods** Peanut allergen Ara h 2 was quantified by filtrating their signature peptides, the synthetic specific peptides standard and its internal standard. Current validated method was successfully applied to the determination of the peanut allergen Ara h 2 content in 20 kinds of peanut in different regions. And the results showed the conversion coefficient of peanut allergen Ara h 2 and peanut protein. Thus, Ara h 2 was chosen as biomarker to detect peanut protein in 10 kinds of roasted food. **Result** The limit of quantitation with peanut allergen Ara h 2 in peanut samples was 4.45 $\mu\text{g/g}$ and the recoveries were 106.0%~107.8%. In roasted food, the limit of quantitation was 6.23 $\mu\text{g/g}$ and recoveries were in the range of 107.0%~113.2%. **Conclusion** Compared to the previous methods, the developed approach is a highly specific, sensitive and accurate method, which has a good application prospect.

KEY WORDS: peanut allergens; liquid chromatography-mass spectrometry; Ara h 2; specific peptide

*通讯作者: 任一平, 高级工程师, 主要研究方向为卫生理化检验技术、食品安全检测技术。E-mail: renyiping@263.net

*Corresponding author: REN Yi-Ping, Senior Engineer, Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China. E-mail: renyiping@263.net

1 引言

花生是重要过敏原食物之一,由它引起的过敏反应占食物过敏的1%~20%^[1,2]。目前,国际过敏原命名委员会认为花生中含有13种致敏蛋白^[3]。其中Ara h 2是主要花生过敏原,约占花生蛋白总量的5.9~9.3%^[4],能被90%以上的花生过敏患者血清所识别^[5,6]。Ara h 2存在两种异构体^[7,8],包含10个线性IgE结合位点^[9]。Ara h 2稳定性高、耐酶解,主要原因是Ara h 2含有大量二硫键以保持其自身结构的稳定性^[10,11]。Ara h 2具有典型的胰蛋白酶抑制剂的结 构,并且经过烘烤处理后,Ara h 2蛋白的抑制剂活性被显著提高^[12]。

目前,检测食物中花生过敏原成分主要有2种方法。一种是基于花生过敏原基因残留检测的方法,如聚合酶链式反应(PCR)^[13]。PCR技术是基于DNA的检测技术,而不直接检测致敏蛋白,所以PCR法无法对花生致敏蛋白进行准确定量。另外一种基于致敏蛋白检测的方法,如酶联免疫法(ELISA)^[14]。但加热过程会改变蛋白质结构,导致抗体无法正确识别致敏蛋白,使ELISA法的最终检测结果偏低。同时加热过程也会使致敏蛋白变性,产生聚合反应产物和美德拉反应产物,改变致敏蛋白的溶解性^[15]。因为变性蛋白溶解度降低不易被溶剂提取,所以无法使用ELISA法进行检测^[16]。此外,ELISA法采用抗原抗体技术不可避免会产生交叉反应,导致假阳性现象,也会影响最终检测结果的准确性。因此ELISA法也无法用于花生致敏蛋白的准确定量。

现阶段有人尝试将蛋白质组学与液质联用技术运用到对蛋白质的定性定量分析。Heick等^[17]利用液质联用法同时定性检测多种过敏原,其中花生的检测限为11 mg/kg。Shefcheck等^[18]采用液质联用法检测冰激凌中Ara h 1的特异性肽链,检测限达到10 mg/kg。随后Shefcheck等^[19]通过优化蛋白提取过程,将黑巧克力中Ara h 1检测限降低至2 mg/kg。Lutter等^[20]建立对食品中牛奶蛋白的SRM方式检测方法,其定量限达到2 mg/kg。该方法利用稳定同位素标记的氨基酸按照特异肽序列合成内标,在预处理结束后加入样品中用以校正质谱离子化的不稳定性。Zhang等^[21]在Lutter等人方法的基础上进一步完善实验方案,设计了同位素标记的长多肽作为内标。该多

肽以同位素标记的特异肽序列为基础,根据乳铁蛋白的序列,向氮端和碳端各延长6~8个氨基酸。该多肽在酶切后可形成同位素标记的特异肽,所以它不但能对离子化过程进行校正,而且能校正基质对酶切过程造成的干扰,使建立的方法较之前的方法更加准确可靠。

本文的目的是:1.将蛋白组学和液质联用技术应用到过敏原检测领域中,通过对花生致敏蛋白酶切,筛选出特异性肽段;2.人工合成肽段标准品和同位素内标,建立对花生致敏蛋白Ara h 2的准确定量检测方法;3.以Ara h 2作为生物标记物,对10种常见烘焙食品中的花生致敏蛋白进行检测分析。

2 材料和方法

2.1 化学试剂

碳酸氢铵(NH₄HCO₃)、二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺(IAA)(分析纯)购自美国Sigma公司;乙腈、甲酸(色谱纯)购自德国Merck公司。

特异肽段标准品NLPQQCGLR购自上海强耀生物科技有限公司,纯度均大于95%;同位素标记内标肽段QFKRELRNL*PQQCGL*RAPQRCD(L*表示碳、氮全标记了同位素的亮氨酸)购自上海强耀生物科技有限公司,纯度均大于90%。;超纯水由Milli-Q超纯水净化系统制备获得。

2.2 仪器设备

超高效液相色谱-串联飞行时间质谱(UPLC/XEVO Q-TOF,美国Waters公司);超高效液相色谱-串联四极杆质谱(UPLC/XEVO TQ-S,美国Waters公司);GM200刀式混和研磨仪(德国Retsch公司);MM400球磨仪(德国Retsch公司);L-8900全自动氨基酸分析仪(日本日立Hitachi公司)。

2.3 色谱条件与质谱条件

2.3.1 色谱条件

色谱柱:Acquity BEH 300 C₁₈柱(1.7 μm, 2.1 mm×100 mm);柱温:40 °C;进样体积:5 μL;流动相A:0.1%甲酸/水;流动相B:0.1%甲酸/乙腈;流速0.3 mL/min;洗脱程序:0~10 min,流动相A 97%~60%;10~10.1 min,流动相A 60%~100%;10.1~12 min,流动相A 100%;12~12.1 min,流动相A 100%~97%;12.1~15 min,流动相A 97%。

2.3.2 质谱条件

电喷雾离子源电离模式: ESI+; 毛细管电压: 3.5 kV; 脱溶剂气温度: 500 °C; 脱溶剂气流量: 800 L/min; 锥孔反吹气流量: 150 L/h; 碰撞室压力: 7.0×10^{-3} mbar; 低端分辨率 1: 2.77 V; 高端分辨率 1: 15.09 V; 离子能量 1: 0.1; 低端分辨率 2: 2.80 V; 高端分辨率 2: 14.79 V; 离子能量 2: 0.6; 离子源温度: 150 °C; 提取器电压: 3.0 V; 入口透镜电压: 0.5 V; 出口电压: 0.5 V; 碰撞梯度: 4.0。扫描方式: 多离子反应监测(MRM)。花生致敏蛋白 Ara h 2 特异肽标准品和特异肽内标的质谱参数, 见表 1。

2.4 标准储备液的配制

分别精密称取约 2~3 mg 花生过敏原 Ara h 2 的特异性肽段标准品(NLPQQCGLR)和特异性肽段同位素内标标准品(QFKRELRLNLPQQCGLRAPQRCD)于 5 mL 容量瓶中, 用超纯水溶解并定容至 5 mL。然后利用氨基酸分析仪进行纯度鉴定^[22]。按照纯度鉴定结果进行稀释, 配制成浓度为 10 μ mol/L 的标准品储备液。

2.5 标准曲线以及内标的配制

分别精密移取一定量的 Ara h 2 的特异肽段标准品储备液用超纯水稀释后, 配制成浓度为 5、10、20、40、60、80、100 nmol/L 的标准曲线溶液。同样分别精密移取一定量的同位素内标储备液用超纯水稀释后, 配制成浓度为 20 nmol/L 的同位素内标溶液。

2.6 样品预处理

准确称取 0.1 g 研磨均匀的样品, 加 1 mL 超纯水以及 3 颗粒径为 2 mm 的小铁球, 用球磨仪以 25 次/s

的频率振荡提取 10 min, 制得样品悬浊液。将样品悬浊液以 1:50 比例用水稀释后, 取 10 μ L 样品稀释液, 加 825 μ L 超纯水、10 μ L 同位素内标和 10 μ L 的 600 mmol/L DTT, 60 °C 水浴加热 30 min。然后加入 30 μ L 的 600 mmol/L IAA, 室温下暗处静置 30 min。接着加入 100 μ L 500 mmol/L 碳酸氢铵溶液和 10 μ L 400 μ g/mL 胰蛋白酶, 在 37 °C 水浴中酶切 3 h。最后加入 5 μ L 的甲酸终止反应。过 0.22 μ m 滤膜, 用液质联用仪进行分析。

2.7 计算公式

2.7.1 基质效应评价计算公式

$$SSE(\%) = \frac{100 \times slope_{matrix}}{slope_{standard}}$$

式中:

SSE: 基质效应 %

$slope_{standard}$: 标准曲线的斜率

$slope_{matrix}$: 基质曲线的斜率

2.7.2 花生样品中花生过敏原 Ara h 2 蛋白质的含量计算公式:

$$X = \frac{c \times V \times M}{m \times 100}$$

式中:

X—花生样品中花生过敏原 Ara h 2 蛋白质的含量, 单位为微克每克(ug/g)

c—样品酶解后的浓度, 单位为纳摩尔每升(nmol/L)

V—样品酶解后的体积, 单位为 mL

M—花生过敏原 Ara h 2 蛋白质相对分子质量, 单位克/摩尔(g/mol)

m—花生样品质量

表 1 MRM 参数
Table 1 Conditions of multiple reaction monitoring

蛋白	序列	母离子 (m/z)	锥孔电压 (V)	子离子 (m/z)	碰撞能量 (eV)	片段类型
Ara h 2	NLPQQCGLR	543.6	22	633.4	24	y5
				761.5	24	y6
				858.6	19	y7
	NL*PQQCGL*R	550.6	22	640.4	24	y5
				768.6	24	y6
				865.8	19	y7

2.7.3 食品中花生蛋白残留量的计算公式:

$$X = \frac{c \times V \times M}{m \times 1000 \times 0.0647}$$

式中:

X —食品中花生蛋白残留量,单位为微克每克($\mu\text{g/g}$)

c —样品酶解后溶液的浓度,单位为纳摩尔每升(nmol/L)

V —样品酶解后溶液的体积,单位为毫升(mL)

M —花生过敏原 Ara h 2 蛋白质相对分子质量,单位克/摩尔(g/mol)

m —食品样品质量

花生蛋白含量与花生致敏蛋白 Ara h 2 含量的转换系数为 0.0647

3 结果与讨论

3.1 特异性肽段的筛选

建立蛋白质准确定量的 UPLC-TQ-MS 方法需要选择稳定、可靠,且独一无二的特异性肽段用于花生过敏原 Ara h 2 蛋白质的定性定量检测。本文采用具有高度专一性的碱性胰蛋白酶酶切技术,实验首先制备高浓度花生样品,按照 2.6 方法进行酶解,酶解后的样品用 UPLC-Q-TOF 分离检测。再结合 ProteinLynx 分析软件和 Uniprot 数据库分析从 UPLC-Q-TOF 获得的数据结果。根据所获得的结果找到 11 条 Ara h 2 的水解多肽,多肽覆盖率为 52%,结果见表 2。但是表 2 中所列肽段并不是都适合作为花生过敏原 Ara h 2 蛋白的特异性肽段,需要进一步从中选出合适的特异性肽段。首先,特异性肽段序列应长短适中,以 7~20 个氨基酸残基为宜,且不含有漏切的酶切位点。这需要考虑下一步特异性肽段合成成本以及兼顾肽段的特异性。根据该原则,我们可以排除表 2 中 Ara h 2 的过长和过短的肽段以及含有漏切的酶切位点的肽段。其次,该肽段要具有较稳定的理化性质,进行 UPLC-TQ-MS 方法分析时有较好的灵敏度和分辨率。因此,从表 2 中筛选出 Ara h 2 响应值和灵敏度较高的 3 条肽段作为特异性肽段的备选多肽。

将选择的备选特异性肽段与 Uniprot 数据库上获得的其他植物蛋白质序列进行比较,证实所选择的肽段不存在于所测定试样的其他蛋白质(如鸡蛋,牛奶等)中,具有高度特异性与专一性,不会产生交叉反应。通过分析 UPLC-Q-TOF 的数据,获得特异性肽

表 2 肽段数据

Table 2 Data of the peptides

Ara h 2			
序号	位置	序列	Q-TOF 打分
1	146~155	NLPQQCGLR	8.3
2	102~115	CCNELNEFENNQR	8.3
3	32~39	CQSGLER	7.8
4	115~131	CMCEALQQIMENQSDR	7.4
5	135~142	QQEQQFK	7.1
6	159~169	CDLEVESGGR	7.4
7	39~52	ANLRPCEQHLMQK	7.1
8	153~162	EVGQEIQTK	6.4
9	133~144	MADVAGYVGQK	6.3
10	18~28	FGDTAAGTNR	6.6
11	4~18	TQPHTVQVHTTAGR	6.4

段的液相色谱保留时间与多肽母离子质荷比。根据这些数据建立 MRM 定量定性检测方法。本文选择响应值最大灵敏度最高的特异性多肽作为花生过敏原 Ara h 2 的定量多肽(NLPQQCGLR)。参照 Zhang 等^[21]的方法合成相应的特异肽段标准品和特异肽段内标,色谱图见图 1。

3.2 方法学验证

分别精密移取一定量的特异肽段标准储备液用超纯水稀释后,配制成标准曲线混合溶液。再加入 10 μL 混合同位素标记内标工作溶液,再按 2.6 步骤处理,过 0.22 μm 滤膜,用液质联用仪分析。然后以特异性肽段的浓度为横坐标,相对峰面积为纵坐标绘制标准曲线,并计算回归方程。Ara h 2 (NLPQQCGLR)的标准曲线线性范围为 5~100 nmol/L ,回归方程为 $Y=0.062X+0.147$,相关系数 $r=0.996$ 。

日内精密度通过重复处理 11 份相同样品获得,Ara h 2 的日内精密度为 3.04%。日间精密度通过每天重复平行处理 6 份相同样品,重复 3 天实验后获得,Ara h 2 的日间精密度为 5.07%。

加标回收率通过在花生样品中加入特异肽来考察。花生样品空白本底值为 14.99 nmol/L 。将高中低 3 个不同浓度的标准品添加到样品,按 2.5 分析步骤检测,计算回收率。每个样品重复检测 3 天,每天 6 个平行样品。结果见表 3。

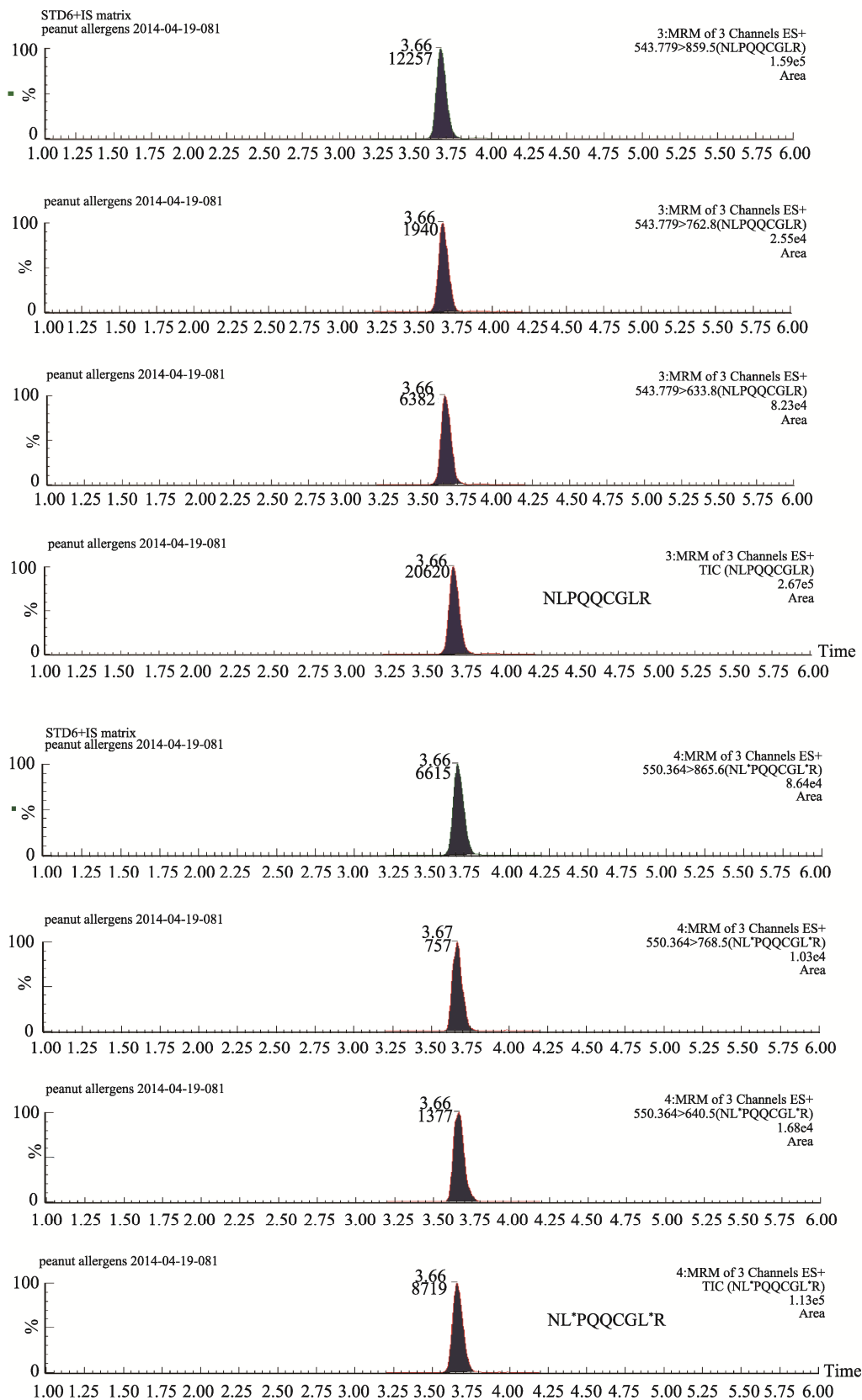


图 1 特异肽和子离子色谱图

Fig. 1 Chromatogram of signature peptides and product ions

表 3 加标回收率($n=6$)
Table 3 Recovery results of spiked peanut ($n=6$)

编号	加标浓度 (nmol/L)	平均值	RSD
Ara h2 (NLPQQCGLR)	10	106.0±7.4%	6.9%
	20	106.3±6.5%	6.1%
	40	107.8±5.0%	4.7%

方法定量限通过低浓度标准品溶液计算获得。配制浓度为 5 nmol/L 标准曲线溶液经预处理后进样 5 次, 计算其定量离子的信噪比。该检测重复进行 4 天, 计算信噪比的平均值。按照 1:10 信噪比为定量限, 计算得本方法的定量限为 4.45 $\mu\text{g/g}$ 。

3.3 不同品种花生中致敏蛋白 Ara h 2 的含量

从中国各地区采集 20 种常见的花生品种。利用本文方法对 20 种花生中的 Ara h 2 含量进行检测分析, 同时, 用凯氏定氮法测定这 20 种花生的总蛋白含量, 结果见表 4。从表中数据我们发现各个地区不同品种花生的总蛋白含量稳定平均值为 26.94%。通过本文方法检测得到各地区花生中致敏蛋白 Ara h 2 的含量, 并计算占花生总蛋白含量, 结果显示符合文献报道的 5.9~9.3%^[4], 说明花生致敏蛋白 Ara h 2 含量大, 是主要花生过敏原, 适合作为检测食品中花生蛋白残留的生物标记物。此外, 还发现 Ara h 2 在不同品种花生中的含量稳定, RSD 为 14.04%。因此, 可以初步统计得出由致敏蛋白 Ara h 2 含量换算花生蛋白含量的转换系数为 0.0647, 为开发食品中花生蛋白残留量的检测方法奠定定量基础。

表 4 不同品种花生中 Ara h 2 的含量
Table 4 Content of Ara h 2 in different peanuts

花生品种	Ara h 2 含量 (g/100 g)	总蛋白含量 (%)	Ara h 2 占总蛋白的 百分含量(%)
汕优 27	1.84±0.11	30.38	6.06
仲恺花 1 号	2.23±0.07	33.11	6.73
汕优 21	1.80±0.07	31.85	5.65
碧油 93	1.85±0.01	30.59	6.05
红花 126	1.88±0.09	29.97	6.27
红花 127	1.70±0.02	26.89	6.32
红花 128	1.71±0.02	25.60	6.67
红花 129	2.27±0.13	28.51	7.96
红花 130	1.75±0.14	29.81	5.87
红花 131	2.28±0.20	32.15	7.09

3.4 烘培食品中花生残留量检测

本文已建立了针对花生样品中花生致敏蛋白 Ara h 2 的准确定量方法, 但是将该方法应用到实际样品时, 仍要考虑食品基质的影响。由于质谱检测是基于化合物离子化并通过特定的质荷比来检测和定量, 因此任何干扰待测物离子化的物质都可能影响检测方法的灵敏度和选择性。为避免食品基质效应影响结果的准确性, 需要对基质效应进行评价。选取面包和饼干作为考察基质, 分别以 10、20、40、60、80、100 nmol/L 6 个浓度点的特异肽标准品为检测点, 配制溶剂标准曲线和基质标准曲线, 各点重复测定 3 次取平均值, 结果见图 2。根据 Sulyok 等^[23]的方法计算评价基质效应(signal suppression/enhancement, SSE), 计算公式如 2.7.1。结果显示面包基质和饼干基质对肽段标准品响应信号都有增益作用(SSE 分别为 105%和 103%)。所以本文采用同位素标记的特异肽作为内标校正基质效应的干扰。

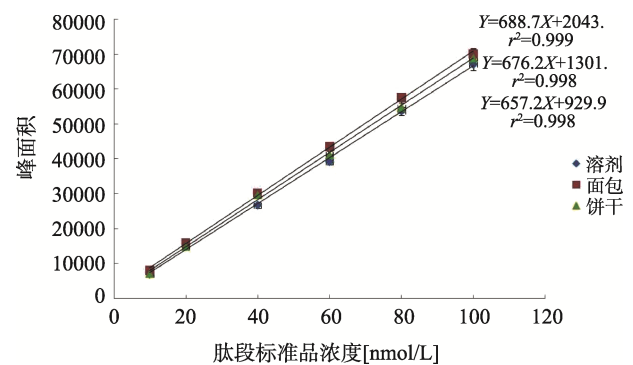


图 2 溶剂标准曲线和基质标准曲线

Fig. 2 Standard curve by water or blank matrix

目前, 国际上对烘培食品中花生过敏原残留量检测限量标准是以花生蛋白计, 为 70 $\mu\text{g/g}$ 。因此, 本文方法选择 Ara h 2 作为生物标记物, 采用初步统计得出致敏蛋白 Ara h 2 和花生蛋白的换算系数, 计算烘培食品中花生蛋白的残留量。分别以 10、40、80 $\mu\text{g/g}$ 三个浓度点的花生做为加标回收检测点, 测得回收率为 107.0%~113.2%。该方法的检测限为 1.87 $\mu\text{g/g}$, 定量限为 6.23 $\mu\text{g/g}$ 。

从杭州地区的某超市购得 10 种烘培食品用于验证所建立方法的适用性。经对包装标签的检查发现并非所有 10 种烘培食品的食品标签中标注有过敏原信

息这一栏。利用本方法对这 10 种烘焙食品进行花生蛋白残留检测, 结果见表 5。结果显示配料和过敏原标签信息列表中不含有花生过敏原的食品, 仍检测出花生蛋白残留, 说明上述食品有未标注过敏源信息之嫌或者在加工生产、运输、销售过程中存在交叉污染的可能性。

表 5 10 种烘焙食品中花生蛋白残留检测
Table 5 The peanut protein content of 10 kinds of roasted food

样品名称	配料(花生)	过敏源信息(花生)	花生蛋白含量 μg/g
蛋黄煎饼	-	未标注	52.89±1.07
菜园小饼	-	未标注	+
家乡鸡蛋酥	-	无	-
牛奶香脆酥性饼干	-	标注	6.67±0.57
核桃酥饼	+	无	47669.75±1.05
草莓夹心饼干	-	标注	16.10±1.05-
饼干	-	未标注	+
蛋黄派	-	无	+
法式软面包	-	未标注	+
原味苏打饼干	-	无	+

注: “+”表示阳性结果, “-”表示阴性结果

4 结 论

本文将蛋白组学和液质联用技术应用到致敏蛋白定量检测领域, 设计并合成了 Ara h 2 的特异肽标准品、同位素特异肽内标, 以 Ara h 2 作为生物标记物检测食品中花生过敏原的方法能更好胜任检测工作, 其定量限可达到 6.23 μg/g, 回收率在 107.0%~113.2%之间。该方法具有特异性强、灵敏度高、定量准确等优势。另外, 该方法通过检测目标蛋白酶切产生的特异性肽段, 来检测目标蛋白, 不受目标蛋白在烘焙过程中热变性的影响, 避免了检测结果出现假阳性或假阴性现象; 同时选择以同位素标记的特异性肽段作为内标, 可以解决基质干扰所带来的一系列问题, 提高了方法的准确度。

参考文献

[1] Macdougall CF, Cant AJ, Colver AF. How dangerous is food allergy in childhood the incidence of severe and fatal allergic

reactions across the UK and Ireland [J]. Arch Dis Child, 2002, 86(4): 236-239.

- [2] Kanny G, Moneret-Vautrin DA, FlabbeeJ, *et al.* Population study of food allergy in France [J]. J Aller Clin Immunol, 2001, 108(1): 133-140.
- [3] IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee [Z]. <http://www.allergen.org/>.
- [4] Koppelman SJ, Vlooswijk RAA, Knippels LMJ, *et al.* Quantification of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2 in the peanut varieties Runner, Spanish, Virginia, and Valencia, bred in different parts of the world [J]. Allergy, 2001, 56(2): 132-137.
- [5] Burks AW, Cockrell G, Stanley JS, *et al.* Recombinant peanut allergen Ara h I expression and IgE binding in patients with peanut hypersensitivity [J]. J Clin Invest, 1995, 96(4): 1715.
- [6] Koppelman SJ, Wensing M, Ertmann M, *et al.* Relevance of Ara h1, Ara h 2 and Ara h 3 in peanut - allergic patients, as determined by immunoglobulin E Western blotting, basophil-histamine release and intracutaneous testing: Ara h2 is the most important peanut allergen [J]. Clin Exp Allergy, 2004, 34(4): 583-590.
- [7] Burks A, Williams LW, Connaughton C, *et al.* Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h II, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge [J]. J Allergy Clin Immunol, 1992, 90(6): 962-969.
- [8] Chatel JM, Bernard HE, Orson FM. Isolation and characterization of two complete Ara h 2 isoforms cDNA [J]. Int Arch Allergy Immun, 2003, 131(1): 14-18.
- [9] Stanley JS, King N, Burks A, *et al.* Identification and mutational analysis of the immunodominantIgE binding epitopes of the major peanut allergen Ara h 2 [J]. Arch Biochem Biophys, 1997, 342(2): 244-253.
- [10] Sen M, Kopper R, Pons L, *et al.* Protein structure plays a critical role in peanut allergen stability and may determine immunodominantIgE-binding epitopes [J]. J Immun, 2002, 169(2): 882-887.
- [11] Lehmann K, Schweimer K, Reese G, *et al.* Structure and stability of 2S albumin-type peanut allergens: implications for the severity of peanut allergic reactions [J]. Biochem J, 2006, 395: 463-472.
- [12] Maleki SJ, Viquez O, Jacks T, *et al.* The major peanut allergen, Ara h 2, functions as a trypsin inhibitor, and roasting enhances this function [J]. J Allergy Clin Immunol, 2003, 112(1): 190-195.
- [13] López-Calleja IM, la Cruz SD, Pegels N, *et al.* Development of a real time PCR assay for detection of allergenic trace amounts of peanut (*Arachishypogaea*) in processed foods [J]. Food Control, 2013, (2): 480-490.
- [14] Poms RE, Agazzi ME, Bau A, *et al.* Inter-laboratory validation

- study of 5 commercial ELISA test kits for the determination of peanut proteins in biscuits and dark chocolate [J]. *Food Add Contam*, 2005, 22(2): 104–112.
- [15] Poms RE, Capelletti C, Anklam E. Effect of roasting history and buffer composition on peanut protein extraction efficiency [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2004, 48(6): 459–464.
- [16] Iqbal A, Ateeq N. Effect of Processing on the detectability of peanut protein by Elisa [J]. *Food Chem*, 2013, 141(3): 1651–1654.
- [17] Heick J, Fischer M, Pöpping B. First screening method for the simultaneous detection of seven allergens by liquid chromatography mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(7): 938–943.
- [18] Shefcheck KJ, Musser SM. Confirmation of the allergenic peanut protein, Ara h 1, in a model food matrix using liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(10): 2785–2790.
- [19] Shefcheck KJ, Callahan JH, Musser SM. Confirmation of peanut protein using peptide markers in dark chocolate using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(21): 7953–7959.
- [20] Lutter P, Parisod V, Weymuth H. Development and validation of a method for the quantification of milk proteins in food products based on liquid chromatography with mass spectrometric detection [J]. *JAOAC Int*, 2011, 94.
- [21] Zhang J, Lai S, Cai Z, *et al.* Determination of bovine lactoferrin in dairy products by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry based on tryptic signature peptides employing an isotope-labeled winged peptide as internal standard [J]. *Anal Chim Acta*, 2014, 829: 33–39.
- [22] 李爽, 张婷, 蔡明明, 等. 氨基酸折算法计算婴幼儿配方粉中乳清蛋白含量方法的评估[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, (1): 2076–2079.
- Li S, Zhang T, Cai M, *et al.* Evaluation of amino acid conversion method for calculating whey protein content in infant formula powder [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, (1): 2076–2079.
- [23] Sulyok M, Berthiller F. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006, 20(18): 2649–2659.

(责任编辑: 李振飞)

作者简介



洪宇伟, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全检测技术。

E-mail: pinfanjiandan1015@163.com



任一平, 教授级高级工程师, 主要研究方向为卫生理化检测技术及食品安全检测技术。

E-mail: renyiping@263.net