

## MALDI-TOF MS 在不同禽肉动物源性成分检测中的研究

方志娟<sup>1</sup>, 李晓芹<sup>1</sup>, 张雪婧<sup>1</sup>, 沈麒亮<sup>1</sup>, 金萍<sup>2</sup>, 叶湖<sup>1\*</sup>

(1. 苏州市食品检验检测中心, 江苏苏州 215104; 2. 苏州市产品质量监督检验院, 江苏苏州 215104)

**摘要** [目的] 建立基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)技术检测不同禽肉动物源性成分的方法, 构建不同禽肉蛋白质分子指纹图谱标准数据库, 对不同禽肉进行鉴别。[方法] 样品用磷酸盐缓冲液提取, 净化后用 MALDI-TOF MS 法测定。采用 ChemPattern 软件对不同禽肉蛋白质分子指纹图谱进行化学计量学分析, 建立识别模型。[结果] 鸡、鸭、鹅 3 种不同禽肉之间具有明显差异。首次建立不同禽肉蛋白质分子指纹图谱标准数据库, 可一次性对每个样品中鸡、鸭、鹅等肉源性成分进行同时分析。[结论] 建立的基于蛋白质组学的鸡、鸭、鹅源性成分鉴定系统具有简便、稳定、准确、重现性好的优点, 适用于不同禽肉中鸡鸭鹅动物源性成分的鉴别。

**关键词** 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 动物源; 成分; 检测; 禽肉

**中图分类号** TS 251.7 **文献标识码** A

**文章编号** 0517-6611(2023)07-0189-04

**doi**: 10.3969/j.issn.0517-6611.2023.07.043



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

### Study on Detection of Animal-derived Components in Different Poultry Meat by MALDI-TOF MS

FANG Zhi-juan, LI Xiao-qin, ZHANG Xue-jing et al (Suzhou Food Inspection and Testing Center, Suzhou, Jiangsu 215104)

**Abstract** [Objective] Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) was used to detect the animal-derived components of different poultry meat. The standard database of protein molecular fingerprints was established to identify different poultry meat. [Method] Samples were extracted with phosphate buffer and determined by MALDI-TOF MS. ChemPattern software was used to carry out chemometric analysis on protein profiles of different poultry meat, and then an identification model was established. [Result] There are obvious differences among three kinds of poultry meat (chicken, duck and goose). It was the first time to establish a standard database of protein molecular fingerprints of different poultry meat, which could be used for simultaneous analysis of chicken, duck, goose and other meat derived components in each sample at one time. [Conclusion] The identification system of chicken, duck and goose based on proteomics has the advantage of simplicity, stability, accuracy and good reproducibility. It is suitable for the identification of animal-derived components of chicken, duck and goose.

**Key words** Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS); Animal-derived; Component; Detection; Poultry

随着生活水平的提高,人们对肉类的需求越来越大,同时对肉类品质也提出了更高的要求<sup>[1]</sup>。“鸭肉冒充羊肉”等一系列事件,让消费者肉类掺假问题越来越重视<sup>[2]</sup>。肉类掺假主要是为了有目的地获得产品的表观价值或降低产品的成本,这种欺诈行为严重损害了消费者的权利和健康,扰乱了市场公平交易机制<sup>[3-5]</sup>。因此,开发高效、灵敏、快速的肉类鉴别技术和体系,有利于打击肉类掺假和欺诈行为,具有非常重要的实用价值和社会意义<sup>[6-8]</sup>。

目前鉴别肉类掺假的方法很多,有实时荧光 PCR 法<sup>[9-11]</sup>、酶联免疫分析法<sup>[12]</sup>、电子鼻结合统计学分析技术<sup>[13-15]</sup>、核磁共振技术<sup>[16-18]</sup>、近红外特征光谱技术<sup>[19-21]</sup>等。MALDI-TOF MS 技术是基质辅助激光解吸电离(MALDI)技术与飞行时间质谱(TOF MS)的结合,具有快速、稳定、准确、重复性好的特点<sup>[22-24]</sup>。近年来,已被越来越多地应用于微生物鉴定等各领域<sup>[25-29]</sup>。研发低成本、高通量的 MALDI-TOF MS 技术可能成为肉类掺假鉴别方法的主流趋势和发展方向。该研究利用 MALDI-TOF MS 技术分析不同禽肉如鸡、鸭、鹅的蛋白质谱图,首次建立不同禽肉蛋白质分子指纹图

谱标准数据库;配合 ChemPattern 先进化学计量学分析,建立基于蛋白质组学的鸡、鸭、鹅源性成分鉴定系统,为鸡、鸭、鹅 3 种不同禽肉动物源性成分的鉴别提供了新思路。

### 1 材料与方法

**1.1 材料与试剂** 磷酸盐缓冲液(PBS)、SA IV 型蛋白、多肽提取或纯化试剂,融智生物科技(青岛)有限公司。禽肉样品(16 批次鸡、25 批次鸭、15 批次鹅),均购自当地超市。

**1.2 仪器与设备** BagMixer 400 拍打式均质器,法国 Interscience 公司;QUAN TOF 1 质谱仪,融智生物科技(青岛)有限公司;AL 204 电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;IQ7000 超纯水机,密理博(中国)有限公司。

### 1.3 试验方法

**1.3.1 禽肉蛋白质的提取。**称取 25 g 禽肉样品(分别为鸡肉、鸭肉、鹅肉),用水清洗,放入无菌袋;倒入 225 mL PBS 到无菌袋;以 4 次/s 的速度均质 2 min;将上清倒入 50 mL 离心管中,4 °C 冰箱,静置 8 h。再从 50 mL 离心管中取上清,即得肉浸液,放入 -80 °C 冰箱备用。取 2 μL 肉浸液,加 18 μL SA IV 型蛋白、多肽提取或纯化试剂,混匀,滴加 2 μL 于靶点正中,干燥,待测。

**1.3.2 质谱数据的采集。**将制备好的样品靶通过检测口放入质谱仪内部托盘并固定。启动激光系统提供脉冲激光,打击样品靶点,在质荷比( $m/z$ ) 2 000~34 000 扫描和采集数据。采用仪器自带分析软件对质谱图进行平滑、对齐、归一化等

**基金项目** 江苏省市场监督管理局科技计划项目(KJ21125003);江苏省市场监管重点实验室项目“食品安全快检技术与产品评价”。

**作者简介** 方志娟(1987—),女,江苏南通人,工程师,硕士,从事食品检验研究。\*通信作者,高级工程师,从事食品检验与质量控制研究。

**收稿日期** 2022-09-01

处理。

**1.3.3 化学计量学分析。**将采集到的 56 组 MALDI-TOF MS 数据导入 ChemPattern 化学计量学软件[科迈恩(北京)科技有限公司],筛选获得共有模式,再对鸡、鸭、鹅 3 种禽肉的差异性进行多元统计分析。

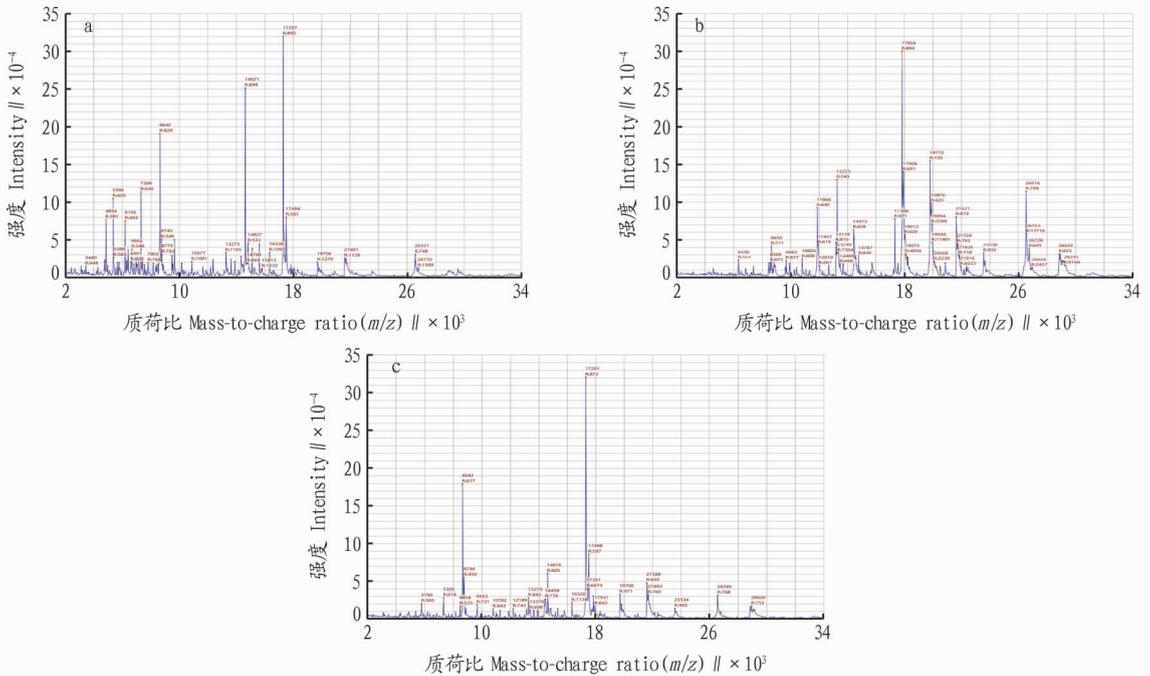


图 1 鸭(a)、鸡(b)、鹅(c)3种不同类型禽肉质谱图

Fig. 1 Mass spectrograms of duck (a), chicken (b) and goose (c) three different types of poultry meat

**2.2 指纹图谱相似度分析** 将质谱数据导入 ChemPattern 软件进行分析,样品图谱经去背景、平滑等规范化前处理,以保留时间对样品图谱进行校正。采用欧氏距离算法分析相

## 2 结果与分析

**2.1 禽肉动物源性成分指纹图谱的建立** 对 56 批次 3 种不同的禽肉进行测定,采集 MALDI-TOF MS 谱图,并进行平滑、对齐、归一化等处理,鸡、鸭、鹅 3 种不同类型禽肉质谱图如图 1 所示。

似度,结果发现(图 2),鸡、鸭、鹅 3 种不同类型禽肉能够归属到各自类别,同一类型产品距离共有模式的距离相当,分离效果较好。

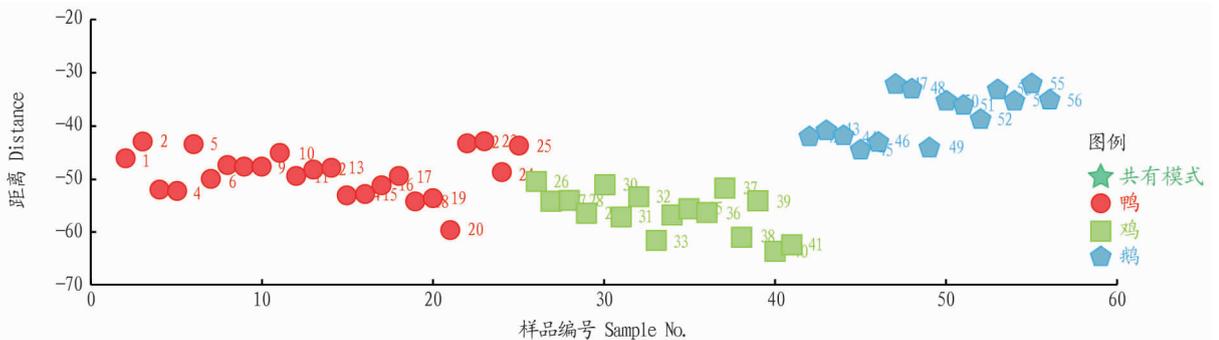


图 2 相似度评价结果

Fig. 2 Similarity evaluation results

**2.3 指纹图谱多元统计分析** 多元统计分析方法常用的有系统聚类分析、主成分分析、偏最小二乘判别分析、自组织映射人工神经网络等<sup>[30]</sup>。系统聚类分析是一组将研究对象分为相对同质的群组的统计分析技术,以距离函数的规律作模式分类,将相似的归为一类,不相似的归为一类<sup>[31]</sup>。主成分分析是一种有效的数据降维方法,仅用部分主成分就能表达原有变量的重要信息<sup>[32]</sup>。偏最小二乘判别分析是对多元线性回归模型的拓展,是偏最小二乘回归的特殊形式。自组织映射人工神经网络广泛适用于复杂体系数据的可视化、降

维、模式识别以及数据挖掘,任意维数的原始数据都可以在保持拓扑结构不变的情况下映射到二维空间内。

鸡、鸭、鹅 3 种不同类型禽肉的系统聚类分析如图 3 所示。它按照不同对象之间的差异,利用欧式距离函数作模式进行分类。图 3b 中的颜色代表归一化法下各个峰所占的面积百分比,可以看出 21、7、20 号峰在 3 种不同类型禽肉中区别较大,是区别 3 种不同类型禽肉的强特征峰。系统聚类分析结果显示 3 种不同类型禽肉能被很好地分开。该分析方法为不同类型禽肉的鉴别提供了依据,可直观地观察每个

样品中的共有峰在样本和自变量 2 个维度中所形成的聚类模式,以及其对聚类结果的影响,同时能够清楚地反映出样

本或变量的亲疏关系。

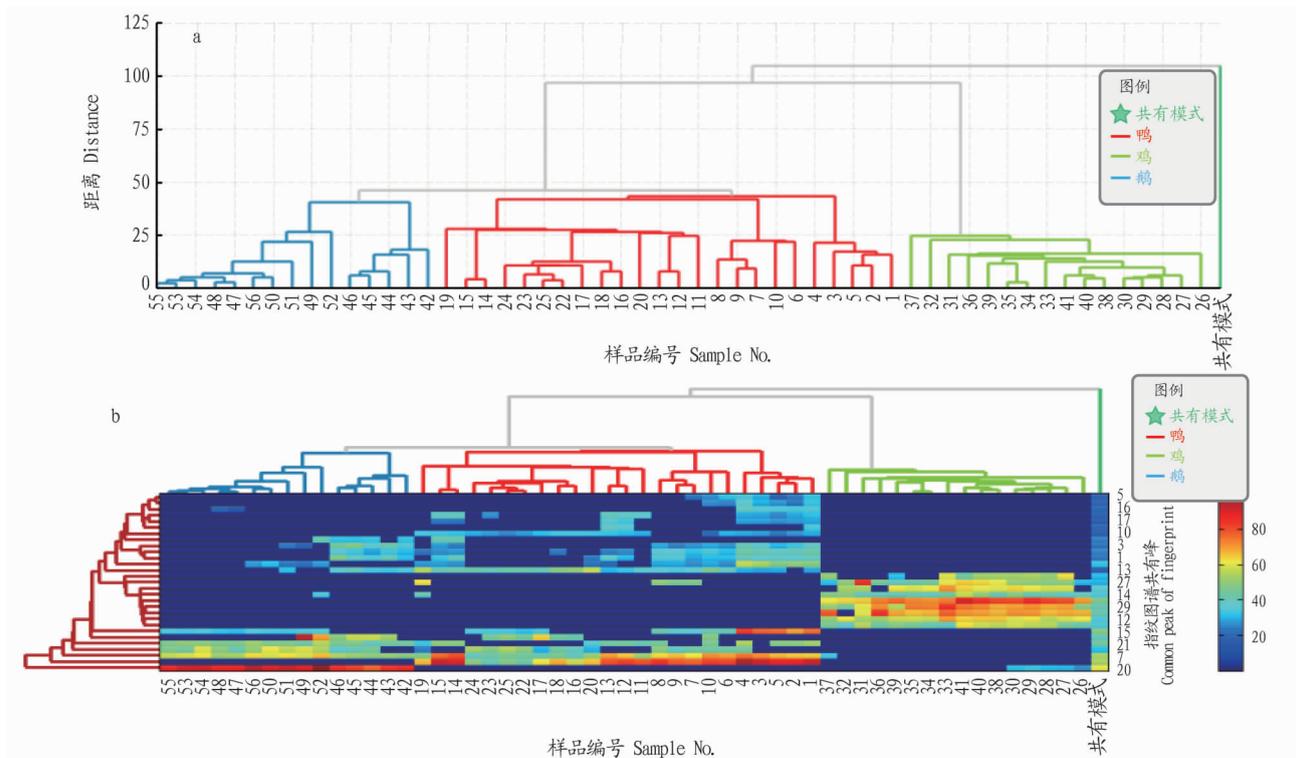


图 3 一维(a)、二维(b)聚类分析结果

Fig. 3 Results of one-dimensional (a) and two-dimensional (b) cluster analysis

图 4~5 分别为鸡、鸭、鹅 3 种不同类型禽肉的主成分分析和偏最小二乘回归分析,2 种不同的分析方法结果完全相同;尽管鹅的样品中 49、52 号样品出现偏离现象,但从图中可以看出,3 种不同类型禽肉能很好地被分开。自组织映射神经网络分析(图 6)显示的样品位置情况更为直观,样品分类结果与前 2 种分析方法一致。

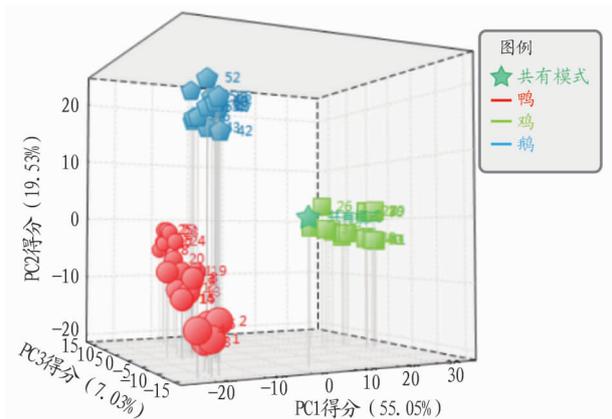


图 4 主成分分析图谱

Fig. 4 Principal component analysis map

2.4 化学模式识别 将鸡肉样品作为测试集,采用 PLS-DA 算法进行模式识别,测试结果如表 1、图 7 所示。从表 1 和图 7 可以看出,鸡肉样品全部被识别,误识率为 0、识别率达 100%。因此,所建立的模型能够提供一个稳定的评价标准,准确判定所选禽肉的类型。

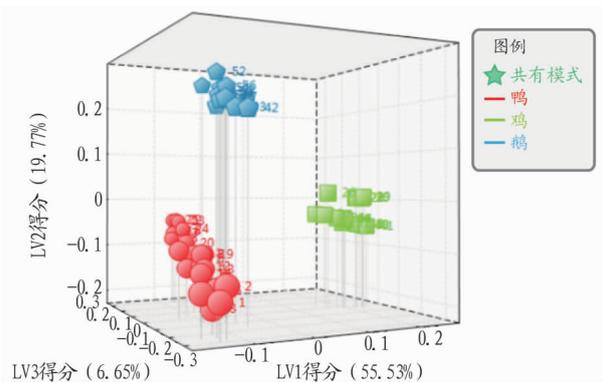


图 5 偏最小二乘回归分析图谱

Fig. 5 Partial least squares regression analysis map

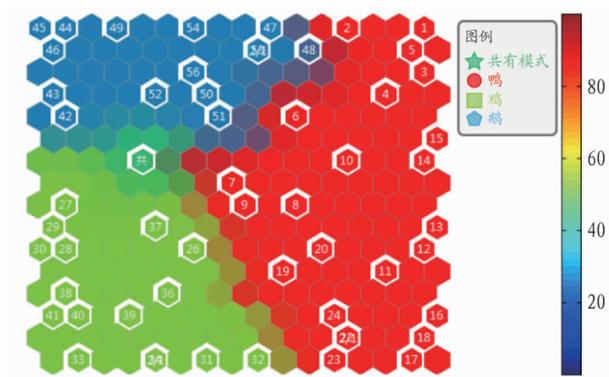


图 6 自组织映射神经网络图谱

Fig. 6 Self-organizing map neural network map

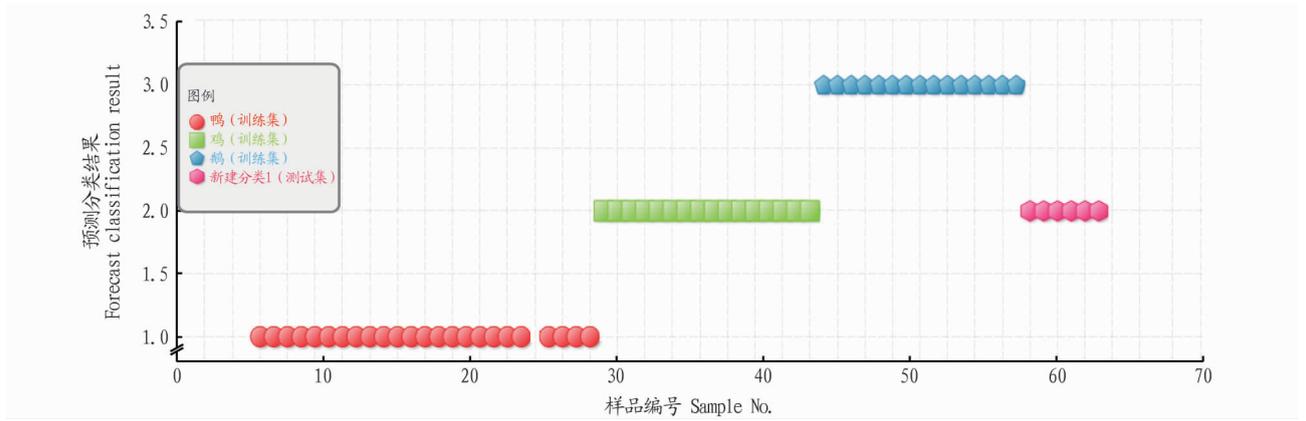


图7 PLS-DA 模型分类预测效果

Fig. 7 Classification prediction effect of PLS-DA model

表1 模式识别结果统计

Table 1 Statistics of pattern recognition results

| 禽肉<br>Poultry | 归属<br>Attribution | 总样本<br>Total sample | 训练集<br>Training set | 验证集<br>Validation set | 测试集<br>Test set | 拒识率 FRR//% | 误识率 FAR//% |
|---------------|-------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|-----------------|------------|------------|
| 鸭 Duck        | 训练集               | 25                  | 22                  | 3                     | 0               | 0          | 0          |
| 鸡 Chicken     | 训练集               | 16                  | 14                  | 2                     | 0               | 0          | 0          |
| 鹅 Goose       | 训练集               | 15                  | 13                  | 2                     | 0               | 0          | 0          |
| 鸡 Chicken     | 测试集               | 6                   | 0                   | 0                     | 6               | 0          | 0          |
| 合计 Total      |                   | 62                  | 49                  | 7                     | 6               | 0          | 0          |

### 3 结论

该研究采用 MALDI-TOF MS 技术从分子层面对不同禽肉进行鉴定,结果准确可靠。该方法前处理简单,样本只需进行常规肉浸液提取后即可上机检测,每小时可处理 30 个以上的样本,快速高通量。利用构建成的不同禽肉蛋白质分子指纹图谱标准数据库,可一次性对每个样品中鸡、鸭、鹅等肉源性成分进行同时分析。该研究不仅可以为检验检测机构提供一种有效鉴别不同禽肉的检测方法,还可以为监督执法机构提供一种有力的监督手段,维护禽肉食品市场更稳定更健康的发展。

### 参考文献

- [1] MANN N J. A brief history of meat in the human diet and current health implications[J]. *Meat Sci*, 2018, 144: 169-179.
- [2] IAMMARINO M, MARINO R, ALBENZIO M. How meaty? Detection and quantification of adulterants, foreign proteins and food additives in meat products[J]. *Int J Food Sci Technol*, 2017, 52(4): 851-863.
- [3] SENTANDREU M Á, SENTANDREU E. Authenticity of meat products: Tools against fraud[J]. *Food Res Int*, 2014, 60: 19-29.
- [4] 李丹, 王守伟, 臧明伍, 等. 国内外经济利益驱动型食品掺假防控体系研究进展[J]. *食品科学*, 2018, 39(1): 320-325.
- [5] BALLIN N Z, VOGENSEN F K, KARLSSON A H. Species determination-Can we detect and quantify meat adulteration? [J]. *Meat Sci*, 2009, 83(2): 165-174.
- [6] 范梦晨, 韩爱云. 肉类掺假检测技术的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(1): 236-241.
- [7] 何金兴, 崔一笑, 赵晓磊. 肉类掺假检测技术研究进展[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2015, 36(1): 106-112.
- [8] 任君安, 黄文胜, 葛毅强, 等. 肉制品真伪鉴别技术研究进展[J]. *食品科学*, 2016, 37(1): 247-257.
- [9] 苗丽, 张秀平, 陈静, 等. 微滴数字 PCR 法对肉制品中牛源和猪源成分的定量分析[J]. *食品科学*, 2016, 37(8): 187-191.
- [10] 曲勤凤. 重要食品掺假检测技术研究鱼糜制品中主料含量的测定(荧光 PCR 法)[D]. 上海: 复旦大学, 2011.

- [11] 张谊, 汤思凝, 梅汝蕃, 等. 羊肉中貉源成分 Real-time PCR 检测方法的建立[J]. *安徽农业科学*, 2023, 51(1): 179-182, 187.
- [12] 任秀, 骆海朋, 崔生辉. 酶联免疫吸附法和 DNA 检测法在肉类鉴别中的应用[J]. *中国食品卫生杂志*, 2015, 27(1): 93-97.
- [13] VAN DE GOOR R M G E, VAN HOOREN M R A, HENATSCH D, et al. Detecting head and neck squamous carcinoma using a portable handheld electronic nose[J]. *Head Neck*, 2020, 42(9): 2555-2559.
- [14] 王亚雷, 贾文坤, 潘立刚, 等. 电子鼻技术在肉类品质应用中快速分析初探[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(2): 419-424.
- [15] 田晓静, 王俊. 电子鼻技术在肉与肉制品检测中的应用进展[J]. *肉类研究*, 2012, 26(6): 42-45.
- [16] 马妍. 探讨低场核磁共振技术在食品安全快速检测中的应用[J]. *食品安全导刊*, 2020(24): 175.
- [17] 盖圣美, 游佳伟, 张中会, 等. 低场核磁共振技术在肉类品质安全分析检测中的应用[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(20): 5294-5300.
- [18] 吴艺影, 章倩汝, 韩剑众, 等. 基于低场核磁共振技术的注胶肉快速检测[J]. *肉类研究*, 2013, 27(3): 26-29.
- [19] 唐鸣, 田潇瑜, 王旭, 等. 基于近红外特征波段的注水肉识别模型研究[J]. *农业机械学报*, 2018, 49(S1): 440-446.
- [20] 俞晗月. 肉类掺假高光谱检测的数据处理方法研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2019.
- [21] 郎玉苗, 杨春柳, 李翠, 等. 光谱技术在肉品掺杂掺假鉴别中的应用研究进展[J]. *肉类研究*, 2019, 33(2): 72-77.
- [22] DOMON B, AEBERSOLD R. Mass spectrometry and protein analysis[J]. *Science*, 2006, 312(5771): 212-217.
- [23] 吴炜亮, 李晓明, 朱文亮, 等. 飞行时间质谱技术及其在食品安全检测中的应用[J]. *食品与机械*, 2015, 31(3): 236-241.
- [24] LAVIGNE J P, ESPINAL P, DUNYACH-REMY C, et al. Mass spectrometry: A revolution in clinical microbiology? [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2013, 51(2): 257-270.
- [25] 左惠心, 韩玲, 余群力, 等. 牦牛与黄牛肌肉差异蛋白质组及生物信息学分析[J]. *农业机械学报*, 2017, 48(4): 313-320.
- [26] 任冠恒, 刘宁国, 陈亿九, 等. MALDI-TOF-MS 对 DAI 大鼠脑干蛋白质组学的分析[J]. *法医学杂志*, 2016, 32(1): 13-17.
- [27] 杨祖顺, 汤晓召, 邹颜秋硕, 等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法鉴定食品中金黄色葡萄球菌[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(10): 3710-3714.

平的抗氧化剂混合标准溶液,每个水平重复 6 次,按试验方法进行测定,其回收率和 RSD 结果见表 2。结果表明,9 种抗氧化剂的回收率为 75.2%~104.7%,RSD 均小于 10%,满足方法测定要求。

### 3 结论与讨论

该研究通过优化流动相、色谱柱,缩短了 9 种抗氧化剂的分析时间至 18 min。在 18 min 内,9 种抗氧化剂有效分离,峰型良好,响应强度增加。明确了固体含油食品的油脂浸提步骤,加入 1~2 倍体积的石油醚提取 4 h 后氮吹至溶剂挥发完全。采用乙腈提取抗氧化剂,可明显提高 BHT 的回收率。经薯片样品进行方法学验证,9 种抗氧化剂的回收率为 75.2%~104.7%,RSD 均小于 10%,满足方法测定要求。

表 1 9 种抗氧化剂的保留时间和线性方程

Table 1 Retention times and linear equations of 9 antioxidants

| 抗氧化剂<br>Antioxidant | 保留时间<br>Retention<br>time/min | 标准曲线<br>Standard curve | $R^2$   |
|---------------------|-------------------------------|------------------------|---------|
| PG                  | 6.181                         | $y=33\ 057x-43\ 460$   | 0.999 5 |
| THBP                | 7.064                         | $y=37\ 554x-52\ 546$   | 0.999 6 |
| TBHQ                | 7.579                         | $y=9\ 128x-11\ 872$    | 0.999 6 |
| NDGA                | 8.716                         | $y=13\ 800x-19\ 032$   | 0.999 4 |
| BHA                 | 9.429                         | $y=8\ 684x-10\ 479$    | 0.999 7 |
| OG                  | 9.702                         | $y=24\ 143x-39\ 415$   | 0.999 4 |
| Ionox-100           | 9.929                         | $y=4\ 575x-6\ 352$     | 0.999 5 |
| DG                  | 11.444                        | $y=19\ 474x-30\ 587$   | 0.999 6 |
| BHT                 | 11.872                        | $y=6\ 083x-6\ 917$     | 0.999 7 |

表 2 薯片样品中 9 种抗氧化剂的回收率和精密度试验 ( $n=6$ )

Table 2 Recovery rates and precision test of 9 antioxidants in potato chips samples

单位:%

| 抗氧化剂<br>Antioxidant | 20 mg/kg             |      | 40 mg/kg             |      | 100 mg/kg            |      |
|---------------------|----------------------|------|----------------------|------|----------------------|------|
|                     | 回收率<br>Recovery rate | RSD  | 回收率<br>Recovery rate | RSD  | 回收率<br>Recovery rate | RSD  |
| PG                  | 91.8                 | 2.12 | 93.0                 | 2.47 | 93.7                 | 4.15 |
| THBP                | 95.6                 | 2.21 | 96.5                 | 2.52 | 95.6                 | 4.30 |
| TBHQ                | 85.4                 | 3.00 | 85.5                 | 2.56 | 83.3                 | 4.08 |
| NDGA                | 82.2                 | 3.11 | 85.7                 | 2.58 | 88.7                 | 4.11 |
| BHA                 | 82.9                 | 2.08 | 80.7                 | 2.67 | 84.6                 | 4.67 |
| OG                  | 104.7                | 2.62 | 102.7                | 2.31 | 98.5                 | 4.66 |
| Ionox-100           | 92.2                 | 2.17 | 92.8                 | 2.52 | 92.9                 | 4.36 |
| DG                  | 83.6                 | 2.99 | 83.3                 | 2.59 | 83.5                 | 5.06 |
| BHT                 | 78.1                 | 2.12 | 79.4                 | 2.73 | 75.2                 | 4.39 |

### 参考文献

- 常馨月,陈程莉,龚娣,等.天然抗氧化剂抑制油脂氧化的研究进展[J].中国油脂,2020,45(4):46-50.
- 邵亮亮,杜京霖,张谷平,等.高效液相色谱法同时快速测定植物油中的三种抗氧化剂[J].粮食与食品工业,2019,26(6):49-53,58.
- 崔利辉,李璐琦,胡娜.超高效液相色谱法测定食用油中 9 种抗氧化剂[J].中国食品,2021(11):84-85.
- 孟繁磊,蔡玉红,张国辉,等.UPLC 测定食用油中 10 种抗氧化剂[J].中国油脂,2018,43(2):134-137.
- 辛丽娜,刘常凯,何林飞.HPLC 法同时测定月饼中 9 种抗氧化剂的研究方法[J].中国食品添加剂,2019,30(9):176-181.
- 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.食品安全国家标准 食品添加剂使用标准:GB 2760—2014[S].北京:中国标准出版社,2014.
- 石金娥,王莹,王庆峰,等.油脂提取前粉碎和去壳对熟制坚果与籽类食品中抗氧化剂测定的影响[J].中国卫生检验杂志,2021,31(16):1944-1946,1970.
- 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局.食品安全国家标准 食品中 9 种抗氧化剂的测定:GB 5009.32—2016[S].北京:中国标准出版社,2016.
- 王雅雯.食品中油脂提取及过氧化值检测方法的优化[J].现代食品,2022,28(2):127-129.
- 钟慈平,成长玉,苏欣,等.高效液相色谱法测定食用油中抗氧化剂的国家标准方法的优化研究[J].理化检验(化学分册),2021,57(6):519-525.
- 晁桂梅.高效液相色谱法测定食用油中 9 种抗氧化剂[J].分析仪器,2020(6):28-31.
- 陈果,毛红.QuEChERS-高效液相色谱法快速检测食用油中 4 种抗氧化剂[J].食品安全质量检测学报,2018,9(21):5587-5591.
- 高军,张浩然,田恺,等.高效液相色谱法同时测定饲料中 5 种合成类抗氧化剂含量[J].中国饲料,2022(17):80-88.
- STAHN A,SCHRÖDER U.Development of a MALDI-TOF MS-based protein fingerprint database of common food fish,allowing fast and reliable identification of fraud and substitution[J].J Agr Food Chem,2017,65(34):7519-7527.
- SALLA V,MURRAY K K.Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry for identification of shrimps[J].Anal Chim Acta,2013,794:55-59.
- 刘秀明,李涛,李源栋,等.基于 NIR 分析和模式识别技术的葛根品种及产地判别[J].食品工业科技,2018,39(22):247-251.
- 郑岩,汤庆莉,吴天祥,等.GC-MS 法建立贵州茅台酒指纹图谱的研究[J].中国酿造,2008,27(9):74-76,91.
- 孙灵霞,陈锦屏,赵改名,等.化学计量学在食品分析中的应用研究进展[J].食品工业科技,2012,33(7):444-448,452.

(上接第 192 页)