

用于质谱检测的芝麻过敏原高效提取方法比较

李静^{1,2}, 于宁², 康文瀚², 万洋², 张九凯², 葛毅强³, 陈颖^{2*}

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

(2. 中国质量检验检测科学研究院, 北京 100176) (3. 中国农村技术开发中心, 北京 100045)

摘要: 芝麻是八大类过敏原食物之一, 近年来随着芝麻及其衍生产品销量的持续增长, 芝麻过敏病例逐渐上升, 因此对芝麻过敏原的检测尤为重要。质谱法可以实现过敏原精准检测, 而过敏原蛋白的高效提取是其有效识别的前提和基础。目前, 主要以芝麻榨油副产物或生芝麻为研究对象进行芝麻蛋白提取优化研究。为了深入探究加工食品中芝麻过敏原蛋白的提取方法, 以生芝麻、熟芝麻及芝麻加工制品为靶标, 优化芝麻蛋白提取条件。根据蛋白粗提液中质谱鉴定等结果, 确定加工制品中芝麻蛋白的最佳提取方法。结果表明, 使用尿素缓冲溶液 ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl+ $7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素+ $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫脲+质量分数 4% CHAPS, pH 值 8.5), 在振荡结合超声提取 40 min 的条件下, 可有效提取加工制品中芝麻蛋白。即使是经过加工的熟芝麻, 蛋白提取质量浓度也可达到 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以上。使用该蛋白提取条件能高效提取加工制品中芝麻蛋白, 为质谱法痕量检测芝麻过敏原提供技术支撑, 有助于芝麻过敏原标签标识的建立。

关键词: 芝麻; 过敏原蛋白; 蛋白提取; 加工制品; 质谱鉴定

文章编号: 1673-9078(2026)05-167-174

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.5.0285

Comparison of Efficient Extraction Methods for Sesame Allergens for Mass Spectrometry Detection

LI Jing^{1,2}, YU Ning², KANG Wenhan², WAN Yang², ZHANG Jiukai², GE Yiqiang³, CHEN Ying^{2*}

(1.College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

(2.Chinese Academy of Quality and Inspection & Testing, Beijing 100176, China)

(3.China Rural Technology Development Center, Beijing 100045, China)

Abstract: Sesame is one of the eight major allergenic foods, and with the increasing consumption of sesame-based products in recent years, the incidence of sesame allergy has risen accordingly. Accurate detection of sesame allergens is therefore of crucial importance for food safety. Mass spectrometry provides a reliable approach for allergen identification; however, efficient extraction of allergenic proteins is a critical prerequisite for successful detection. Most existing studies on sesame protein extraction focus on raw sesame seeds or sesame oil by-products. To optimize extraction methods for sesame allergens in processed foods, both raw sesame and processed sesame products were used as test samples. Based on mass spectrometric identification of proteins in crude extracts, an optimal extraction method for sesame allergen proteins in processed products was established. The results showed that sesame proteins from processed products could be effectively extracted using a urea-based buffer system ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ urea, $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ thiourea, and 4 wt.% CHAPS, pH value 8.5) combined with shaking and ultrasonic treatment for 40 min.

引文格式:

李静,于宁,康文瀚,等.用于质谱检测的芝麻过敏原高效提取方法比较[J].现代食品科技,2026,42(5):167-174.

LI Jing, YU Ning, KANG Wenhan, et al. Comparison of efficient extraction methods for sesame allergens for mass spectrometry detection [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(5): 167-174.

收稿日期: 2025-03-03 ; 修回日期: 2025-05-06 ; 接受日期: 2025-05-12

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2024YFF1105900)

作者简介: 李静 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食物过敏原检测, E-mail: lij4397@163.com

通讯作者: 陈颖 (1972-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 食品质量安全, E-mail: chenyingcai@163.com

Under these conditions, protein concentrations exceeding 20 mg·mL⁻¹ were obtained, even from processed sesame samples. Efficient extraction of sesame proteins under these conditions provides technical support for trace detection of sesame allergens using mass spectrometry and contributes to the establishment of accurate sesame allergen labelling.

Key words: sesame; allergen proteins; protein extraction; processed foods; mass spectrometry detection

芝麻 (*Sesamum indicum* L.), 被广泛种植的油料作物, 年产量高达数百万吨^[1]。芝麻营养成分丰富, 包括质量分数 44%~57% 的脂质、18%~25% 的蛋白质、13%~14% 的碳水化合物、2.46% 的矿物质和 0.088% 的多酚^[2,3]。因其受热后散发香气, 具有良好的感官性状和营养价值, 被广泛应用于食品行业^[4-6]。然而, 芝麻存在致敏风险, 在 2021 年 5 月 10 日, 根据流行病学、效力、过敏反应严重程度, 粮农组织/世界卫生组织食品过敏原风险评估专家会上, 提出拟将芝麻替代大豆, 列为八大类食物过敏原之一^[7]。芝麻过敏在英国、美国等多个国家都有报道, 目前已有许多国家 (例如美国、澳大利亚、加拿大等) 强制性要求在食品中对芝麻成分进行过敏原标识^[8-10]。

稳定可靠的检测方法有助于芝麻过敏原标签标识的建立, 以酶解肽段为靶标的质谱法已经成为检测加工食品中过敏原蛋白的有效方法, 其不仅具有高灵敏度和准确度还能同时检测多种蛋白^[11]。然而, 高效准确的蛋白提取方法是建立质谱检测过敏原蛋白方法的先决条件之一, 蛋白提取效果直接影响定量结果稳定性^[12]。目前, 芝麻蛋白的提取研究主要存在以下两种情况: 一方面主要围绕芝麻榨油副产物芝麻粕, 采用低共熔溶剂法^[13,14]、水酶法^[15]、碱溶酸沉法^[16]等提取芝麻粕中的蛋白, 实现蛋白高值化利用, 减少蛋白资源的浪费。另一方面, 优化芝麻蛋白提取方法实现过敏原蛋白的灵敏检测。然而, 芝麻过敏原蛋白的提取往往以未加工的原材料为样品, 确定合适的蛋白提取条件。如 Ma 等^[17]以生芝麻为样品确定硫脲混合溶液进行芝麻蛋白提取。然而, 利用该方法提取加工制品中芝麻蛋白时, 加工制品样品易出现凝聚成团的现象, 导致蛋白得率较低。研究表明, 加工工艺会改变芝麻过敏原蛋白的二级结构进而影响蛋白提取^[18], 加工食品中芝麻蛋白的提取成为质谱法检测芝麻过敏原需要突破的技术瓶颈。因此, 以芝麻深加工产品为靶标, 优化芝麻蛋白提取方法, 提高加工制品中芝麻蛋白提取率, 具有一定意义。

采用生芝麻、熟芝麻以及实验室制备的芝麻加工制品作为样品, 对加工制品中芝麻蛋白的提取方式、提取时间等开展了优化研究。基于超高效液相色谱串联质谱和软件分析, 对芝麻蛋白粗提液中七种芝麻过

敏原蛋白进行鉴定, 从而确定加工食品中芝麻蛋白的最佳提取方法, 为质谱精准检测芝麻过敏原蛋白提供基础。确定高效的芝麻蛋白提取方法, 为质谱法痕量检测芝麻过敏原提供技术支撑, 有助于芝麻过敏原标签标识的建立, 保护芝麻过敏患者健康。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

生白芝麻和生黑芝麻, 中国农业科学院油料作物研究所提供。利用翻炒、油炸、烘烤、水煮、蒸制和研磨这六种加工工艺制备芝麻加工制品作为样品。

三(羟甲基)氨基甲烷 (Tris(hydroxymethyl) Aminomethane, Tris)、碳酸氢铵 (Ammonium Bicarbonate, ABC)、3-[(3-胆固醇氨丙基) 二甲基氨基]-1-丙磺酸 (3-[(3-Cholesterol Aminopropyl) Dimethylamino]-1-Propanesulfonic acid, CHAPS)、尿素、硫脲、二硫苏糖醇 (Dithiothreitol, DTT) 及碘乙酰胺 (Iodoacetamide, IAA) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 水、乙腈、甲酸、正己烷、胰蛋白酶 (色谱纯), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 1.5 mol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 值 8.8)、1.0 mol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 值 6.8)、体积分数为 30% 的丙烯酰胺、过硫酸铵、蛋白标准 Marker、四甲基乙二胺, 购自美国 Bio-Rad 公司; 考马斯亮蓝 R250, 上海源叶生物科技有限公司; 0.22 μm 滤膜, 德国 Merck Millipore 公司; 5 kDa 超滤离心管, 德国 Sartorius 公司。

1.2 仪器与设备

10~1 000 μL 移液枪, 真空旋转蒸发仪, 5910 Ri 冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; PowerPac Basic 型凝胶电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; K38FK613 烤箱, 中国苏泊尔股份有限公司; HNDSY800 型水浴摇床, 德国 Wiggins 公司; WNB7 7 L 电热水浴锅, 德国 Memmert 公司; L12-P726 破壁机, 中国九阳电器有限公司; Triple-TOF® 6600 高分辨质谱仪, 美国 AB Sciex 公司; Nexera X2 液相色谱仪, 日本 Shimadzu 公司; Xbridge Peptide BEH C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×150 mm, 3.5 μm, 300 Å), 美国 Waters 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 样品制备

对市售商品及常见芝麻制品的种类进行调研，加工工艺主要为翻炒、油炸、烘烤、水煮、蒸制和研磨。因此选择了这六种常见且广泛应用的加工工艺在实验室制备芝麻模拟加工制品（图 1）。

（1）熟芝麻：取 100 g 生芝麻清洗沥干，中火（900 W）翻炒 10 min。少量多次放入组织研磨机研磨，密封保存于冰箱。

（2）芝麻球：将 100 g 生芝麻、500 g 糯米粉和温水混合揉成面团。将面团均分为 10 g，揉成球状，120 ℃油炸 15 min，待芝麻球膨胀浮起，160 ℃油炸 1 min 定型。

（3）芝麻酱：以 10:1 质量比，在熟芝麻中加入芝麻油，利用破壁机研磨至均一细腻的酱状，大约 5 min，制成芝麻酱。

（4）芝麻包：500 g 面粉、5 g 发酵粉和温水（约 40 ℃）混合揉成面团，室温下发酵 30 min。发酵的面团平均分成约 10 g，擀成薄饼状，加入 5 g 熟芝麻粉作为馅料，制成芝麻包，醒发 30 min，开水（100 ℃）蒸制 15 min。

（5）芝麻饼干：将 100 g 生芝麻、500 g 面粉和温水（约 40 ℃）混合揉成面团。将面团均分为 5 g，按压成饼干，烤箱预热（120 ℃，10 min），180 ℃烘烤 20 min。

（6）芝麻汤圆：500 g 糯米粉与温水（约 40 ℃）混合揉成面团，平均分成 10 g，按压成薄饼，放入 2 g 熟芝麻粉做为馅料，包裹为生汤圆。锅内水沸腾放入汤圆，水煮（100 ℃，10 min）。

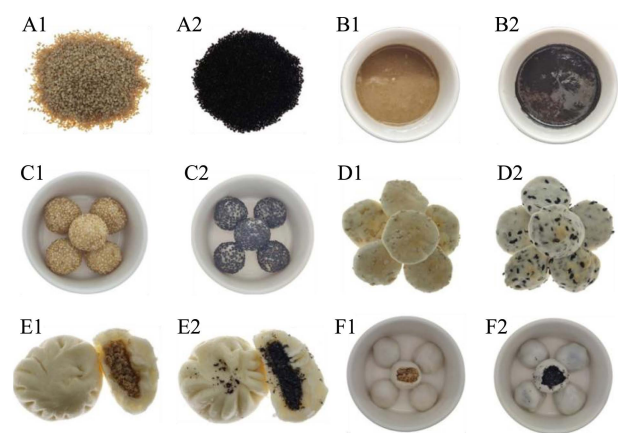


图 1 实验室制备的芝麻加工制品

Fig.1 The sesame processed products prepared in the laboratory

注：1：白芝麻制品；2：黑芝麻制品；A：翻炒；B：研磨；C：油炸；D：烘烤；E：蒸制；F：水煮。

1.3.2 蛋白提取

表 1 芝麻蛋白提取条件优化的样品信息

Table 1 Sample information for optimizing the extraction conditions of sesame protein

加工工艺	样品	编号
油炸	白芝麻球	YZ1
	黑芝麻球	YZ2
翻炒	白芝麻	FC1
	黑芝麻	FC2
水煮	白芝麻汤圆	SZ1
	黑芝麻汤圆	SZ2
蒸制	白芝麻包	ZZ1
	黑芝麻包	ZZ2
研磨	白芝麻酱	YM1
	黑芝麻酱	YM2
烘烤	白芝麻饼干	HK1
	黑芝麻饼干	HK2

对芝麻制品进行脱脂处理，具体操作为：研钵中放入适量芝麻制品，液氮冷冻条件下使用组织研磨机研磨。按照制品：己烷=1:5（*m/V*）的比例加入己烷，室温下搅拌 20 min 后进行离心（4 000 *r·min*⁻¹，10 min）。弃去上清，脱脂重复三次。放置于通风橱使己烷完全挥发，脱脂样品于 -80 ℃ 保存。称取 1 g 脱脂样品，加入 10 mL 蛋白提取缓冲溶液（溶液 A，0.1 mol·L⁻¹ ABC+0.5 mol·L⁻¹ NaCl，pH 值 7.2；溶液 B，50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl+7 mol·L⁻¹ 尿素，pH 值 8.5；溶液 C，50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl+7 mol·L⁻¹ 尿素+2 mol·L⁻¹ 硫脲+质量分数为 4% 的 CHAPS，pH 值 8.5），涡旋 1 min，室温下振荡提取 30 min，水浴超声 30 min。离心（12 000 *r·min*⁻¹，20 min），清液过 0.22 μm 滤膜，按照说明书使用 Qubit™ 试剂盒测定蛋白质量浓度。

为确定加工制品中芝麻蛋白辅助提取方式，以实验室模拟自制的 12 份芝麻加工制品（表 1）为样品，按照上述蛋白提取流程，分别采用振荡 40 min，超声 40 min 和振荡 20 min 结合超声 20 min 这三种辅助蛋白提取方式进行芝麻粗蛋白提取，并设置振荡和超声各自处理的不同时间（5、10、20、30、40 min），根据提取蛋白的质量浓度确定合适的蛋白提取辅助提取条件。

1.3.3 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（Sodium Dodecyl Sulfonate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE）分析

制备聚丙烯酰胺体积分数分别为 12% 分离胶和 5%

浓缩胶。稀释样品蛋白提取溶液至 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，以 1:1 体积比加入上样缓冲液，热水浴 (95°C ， 10 min)。吸取 $10\sim 20 \mu\text{L}$ 上样，开启电源，在 4°C 环境下电泳。总流程为 80 V ，约 20 min ； 120 V ，约 90 min 。使用考马斯亮蓝 R250 染色液染色。弃去染色液，加入脱色液（体积分数为 10% 乙酸，25% 甲醇和 65% 超纯水），脱色后分析图像。

1.3.4 蛋白酶消化

蛋白酶消化采用膜上酶解。对蛋白质量浓度进行标准化以便质谱分析，根据蛋白质量浓度，取含 $200 \mu\text{g}$ 蛋白的粗提液于离心管，加入质谱水至总体积为 $50 \mu\text{L}$ 。加入 $120 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT 溶液 $10 \mu\text{L}$ ，水浴 (37°C ， 1 h)，进行还原反应。加入 $600 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 溶液 $10 \mu\text{L}$ 。室温避光 15 min ，进行蛋白烷基化反应。将液体转移至 5 kDa 超滤膜上，加入 $100 \mu\text{L}$ $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABC 溶液，离心 ($12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ， 15 min)，重复三次，降低尿素质量浓度。加入 $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶 $4 \mu\text{L}$ ， 37°C 水浴过夜。离心 ($12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ， 20 min) 后，重复三次加入 $100 \mu\text{L}$ $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABC 溶液，离心 ($12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ， 15 min)。去掉超滤膜，超滤管放入真空旋转蒸发仪，重复 3 次加入 $100\sim 200 \mu\text{L}$ 质谱水，干燥。加入 $100 \mu\text{L}$ 流动相 A，涡旋混匀，离心 ($10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ， 10 min)，吸取 $80 \mu\text{L}$ 液体至液相小瓶， 4°C 短期保存。

1.3.5 超高效液相色谱串联质谱分析

按以下参数设置超高效液相色谱串联质谱分析条件：

参考李丽芳等^[19]研究设置色谱条件：色谱柱为 Xbridge Peptide BEH C_{18} ($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$ ， $3.5 \mu\text{m}$ ， $300 \text{ \AA}$ ，Waters 公司)；A 相为体积分数 98% 水、2% 乙腈及 0.1% 甲酸；B 相为体积分数 98% 乙腈、2% 水及 0.1% 甲酸；流速为 $0.25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ；柱温 40°C ；进样 $5 \mu\text{L}$ ；按照流动相体积分数，梯度洗脱程序为：0~0.5 min，5%~8% B；0.5~0.6 min，8%~12% B；0.6~25 min，12%~30% B；25~30 min，30%~35% B；30~30.5 min，35%~80% B；30.5~38 min，80% B；38~38.5 min，80%~5% B；38.5~50 min，5% B。

参考房芳等^[20]研究设置质谱条件：Nanospray III 离子源 (ESI+)；离子喷雾电压 2500 V ；雾化气 41.37 kPa ；气帘气 206.84 kPa ；温度 150°C ；信息依赖型采集工作模式；TOF MS $350\sim 1\,500 \text{ m/z}$ ，Q1 扫描累计时间 250 ms ；TOF MS/MS $100\sim 1\,500 \text{ m/z}$ ， 100 ms ；阈值 120 cps ；Q1 电荷 $+2\sim +5$ ；动态排除时间 20 s ；循环时间 2 s ；运行 50 min 。

1.4 数据处理

实验均重复 3 次，结果表示为平均值 $\pm$ 标准差，

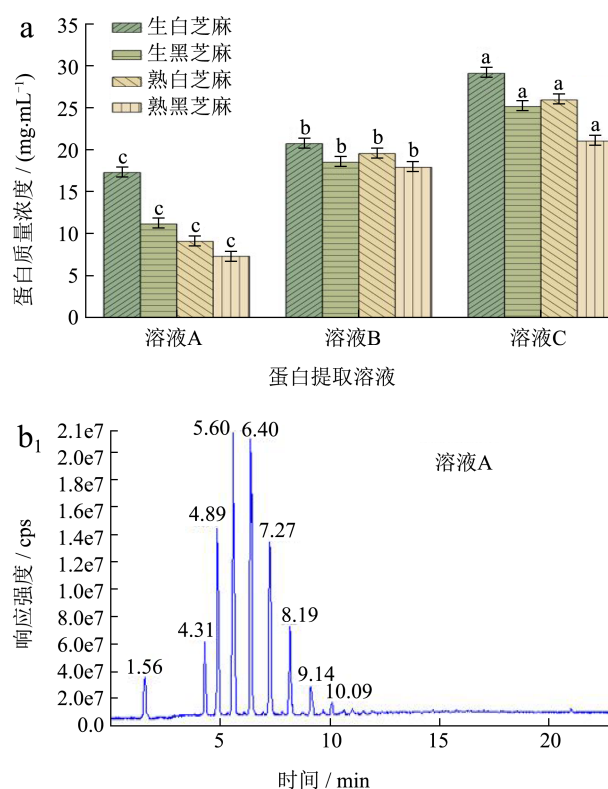
使用 IBM SPSS Statistics 20 对试验数据进行方差分析确定差异显著性 ($P < 0.05$ 表示有显著性差异)，使用 Origin 2022 和 GraphPad Prism 8.0.2 进行图表绘制。

2 结果与讨论

2.1 不同缓冲溶液对样品粗提液蛋白含量的影响

2.1.1 三种缓冲溶液提取蛋白质量浓度的比较

采用三种不同的缓冲溶液（溶液 A， $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABC+ $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl，pH 值 7.2；溶液 B， $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl+ $7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素，pH 值 8.5；溶液 C， $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl+ $7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素 + $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫脲 + 质量分数 4% 的 CHAPS，pH 值 8.5），提取生白芝麻、生黑芝麻、熟白芝麻和熟黑芝麻的蛋白，并测定质量浓度。图 2 表明，无论是生芝麻还是熟芝麻，溶液 C 提取的蛋白质量浓度最高（可达到 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以上），质谱响应强度最强，优于 Ma 等^[17]研究中的蛋白提取效果。溶液 C 提取的蛋白质量浓度显著高于溶液 B，这表明溶液 C 含有的硫脲和 CHAPS 进一步促进了样品中蛋白质的溶解，从而提高了蛋白提取得率和质谱响应强度。这与大豆制品中蛋白提取方法的研究结果一致，使用含有变性剂的缓冲溶液能提高蛋白粗提液质量浓度^[21]。硫脲和尿素两种变性剂共同使用更好地破坏了蛋白质分子间形成的氢键，促使蛋白变性^[22]。同时，CHAPS 作为一种两性离子表面活性剂，增强了蛋白质的溶解度，促进芝麻蛋白的溶解和提取，提高蛋白提取得率^[23]。



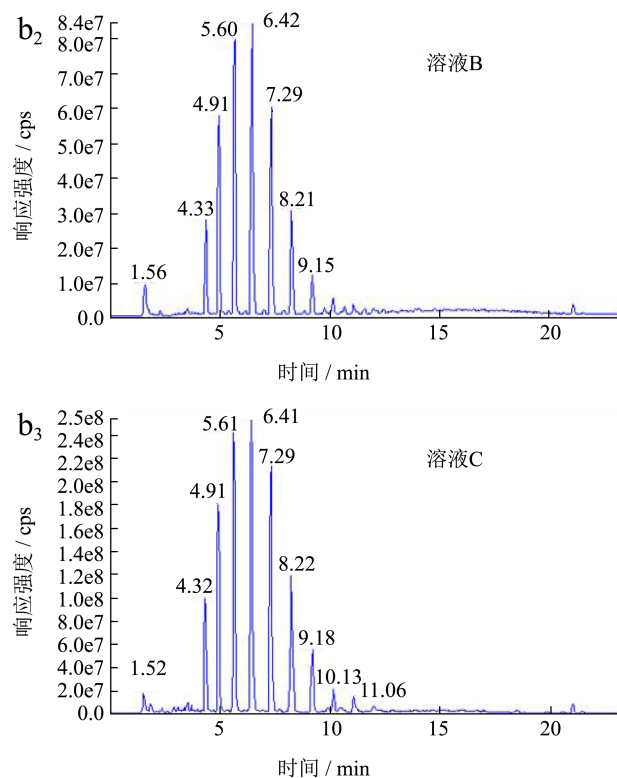


图2 不同缓冲溶液对芝麻蛋白质量浓度及质谱响应强度的影响

Fig.2 The effect of different buffer solutions on sesame protein concentration and mass spectrometry response intensity

注: 小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.1.2 三种缓冲溶液提取蛋白的SDS-PAGE分析

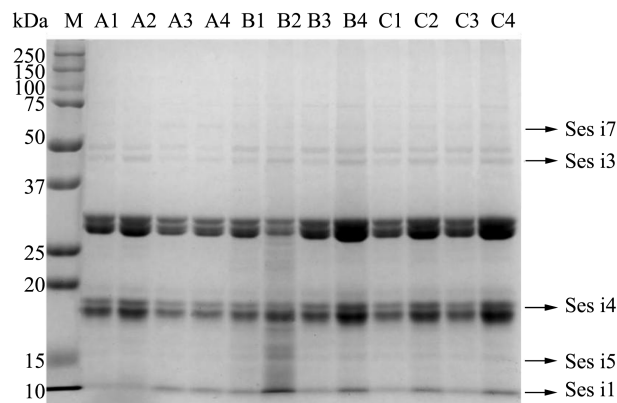


图3 芝麻蛋白提取溶液的SDS-PAGE分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of sesame protein extraction solution

注: M: Marker; A: $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABC + $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, pH 值 7.2; B: $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl + $7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素, pH 值 8.5; C: $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl + $7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素 + $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫脲 + 质量分数 4% CHAPS, pH 值 8.5; 1: 生白芝麻; 2: 生黑芝麻; 3: 熟白芝麻; 4: 熟黑芝麻。

稀释蛋白粗提液, 取一定量蛋白进行 SDS-PAGE 分析。SDS-PAGE 可以根据相对分子量对粗提液中的

蛋白质进行分离, 蛋白条带能够反映蛋白质分布及丰度。结果表明 (图 3), 三种缓冲溶液提取的蛋白条带清晰且全面。相较而言, 在低分子 ($< 15 \text{ kDa}$) 和高分子 ($> 37 \text{ kDa}$) 区域, 溶液 A 提取的蛋白条带强度低于其他两种缓冲溶液。这可能是由于溶液 B 和溶液 C 中含有尿素, 在提取过程中促进蛋白发生变性, 更利于提取^[24]。这与从巧克力样品中提取花生过敏原蛋白的研究结果一致, 使用较高摩尔浓度的尿素可以有效提高花生蛋白提取效率^[21]。即使是经过翻炒的熟芝麻样品, 使用含有尿素的提取溶液 B 和 C 进行蛋白提取, 得到的蛋白条带强度依然较高。因此与溶液 A 相比, 含有尿素的溶液 B 和溶液 C 更适合提取经过加工的样品。

2.2 不同缓冲溶液对质谱鉴定过敏原蛋白的影响

2.2.1 三种缓冲溶液提取芝麻过敏原蛋白的比较

目前国际免疫学会联合会确认的芝麻过敏原有 7 种 (Ses i 1~Ses i 7)。登录 UniProt 数据库获取七种芝麻过敏原蛋白氨基酸序列等信息 (访问日期: 2023 年 7 月 6 日), 导入 ProteinPilot 软件作为数据库, 借助该软件解析质谱谱图。鉴定结果表明, 三种缓冲液提取的蛋白粗提液均检出七种芝麻过敏原蛋白。但溶液 C 提取的蛋白粗提液在特异性肽段数量、蛋白覆盖率等指标上显著优于其他两组: 特异性肽段方面, 溶液 C 蛋白粗提液中可鉴定到 3~5 条非冗余特异性肽段 (如 Ses i 3 的 IPYVFEDQHFITGFR、Ses i 5 的 APHLQLQPR 等), 而溶液 A 和 B 仅检出个别肽段; 鉴定覆盖率方面, 溶液 C 的蛋白平均序列覆盖率达 62.3%, 较溶液 A (41.5%) 和溶液 B (53.1%) 提升显著 ($P < 0.05$)。该结果表明溶液 C 提取到的粗芝麻蛋白溶液中, 七种芝麻过敏原蛋白的提取量占比较高, 为建立精准稳定的芝麻过敏原质谱检测方法提供基础。为评估蛋白质总平均亲水性 (Grand Average of Hydropathicity, Gravy), 将鉴定得到的肽段序列 (去重) 导入在线工具 Expasy (<https://web.expasy.org/protparam/>)。Gravy 值为正, 表示疏水性蛋白; Gravy 值为负, 表示亲水性蛋白。结果显示, 使用缓冲溶液 C 提取的蛋白粗提液中被鉴定的蛋白 Gravy 值 (-0.681) 高于另外两种缓冲溶液 (-0.702 和 -0.715)。这说明, 缓冲溶液 C 提取的蛋白粗提液中疏水蛋白 (如芝麻过敏原蛋白 Ses i 4 和 Ses i 5) 含量较高, 可能是因为两性离子表面活性剂 CHAPS 对疏水性蛋白具有增溶作用, 提高疏水蛋白在水溶液中的溶解性^[25]。

2.2.2 三种缓冲溶液提取芝麻蛋白水解肽段的比较

选择含有 200 μg 蛋白的粗提液发生还原化和烷基化反应, 质谱上样检测, 比较三种缓冲溶液提取的粗蛋白溶液中能鉴定到的七种芝麻过敏原蛋白的肽段数量。分别以生芝麻和熟芝麻为样品, 进行蛋白提取和胰蛋白酶消化, 质谱鉴定结果 (图 4) 表明熟芝麻中过敏原蛋白水解肽段数量低于生芝麻。这与烘焙影响花生过敏原 Ara h 1 的研究结果相似, 经过加工处理后, 过敏原蛋白可鉴定到的肽段数量减少^[26]。这可能是由于翻炒改变了蛋白空间构象: 蛋白质结构变化导致部分酶切位点掩盖, 形成较大分子质量的多肽; 蛋白结构也可能变得疏松, 内部的酶切位点暴露于表面, 形成分子质量更小的多肽。这两种情况产生的多肽超出设定的分子质量检测范围, 因此肽段的数量减少。与其他两种缓冲溶液相比, 使用溶液 C 提取的蛋白溶液可以鉴定到最多的芝麻过敏原蛋白水解肽段, 并且熟芝麻中的水解肽段也大幅度增加。这可能是因为尿素、硫脲及 CHAPS 共同作用, 促进了更多蛋白溶解, 也使蛋白结构更加疏松伸展。酶切位点的充分暴露导致熟芝麻样品中可鉴定的酶解肽段的数量增加 (350 条以下提高至 400 条以上), 降低了与生芝麻样品肽段数量之间的差距, 有利于质谱方法的准确检测。

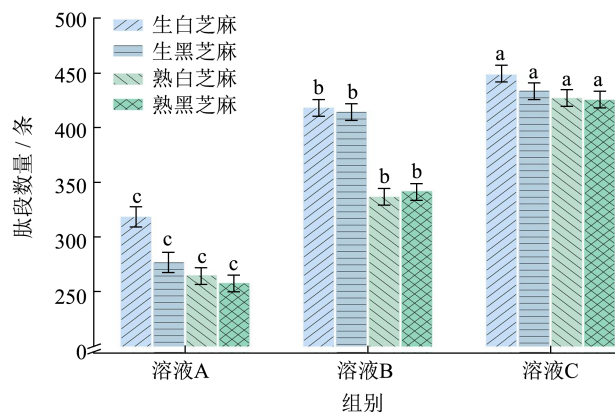


图 4 不同缓冲溶液对质谱鉴定芝麻过敏原肽段的影响

Fig.4 The effect of different buffer solutions on mass spectrometry identification of sesame allergen peptides

注: 小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.3 加工制品芝麻过敏原蛋白提取的其他条件优化

确定使用含有 7 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素、2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫脲和质量分数 4% 的 CHAPS 的 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl 作为缓冲溶液进行芝麻粗蛋白的提取。为提高加工制品中芝麻蛋白提取效率, 选择实验室模拟自制的 12 份芝麻加工制品 (表 1) 作为样品, 比较三种辅助蛋白提取方式 (振荡、超声、振荡与超声结合), 并确定合适的提

取时间, 优化蛋白提取条件。

2.3.1 辅助蛋白提取方式的优化

针对大豆、花生等油料作物进行蛋白提取时, 辅助蛋白提取方式主要为振荡和超声^[27]。因此选择振荡、超声和振荡与超声结合这三种辅助蛋白提取方式, 依据粗提液蛋白质量浓度确定合适的蛋白辅助提取方式。以 12 份实验室模拟制品为样品, 加入缓冲溶液 C, 在室温下分别采用振荡 40 min, 超声 40 min 和振荡 20 min 结合超声 20 min 这三种辅助蛋白提取方式进行加工制品中芝麻粗蛋白的提取。图 5 结果表明, 虽然在油炸、翻炒、蒸制品中, 超声提取 40 min 所得蛋白质量浓度略高于其他两种辅助蛋白提取方式, 但是从整体来看, 使用超声和振荡结合超声这两种辅助蛋白提取方式所提取的粗蛋白质量浓度差异并不显著。相关研究表明, 长时间超声 (30 min 以上) 可能会破坏蛋白结构, 使目标蛋白水解肽段的峰面积下降, 导致定量结果低于实际值^[28]。为了实现加工制品中芝麻蛋白的高效提取和质谱法的灵敏检测, 选择超声和振荡结合辅助的方式进行加工制品中芝麻蛋白提取。

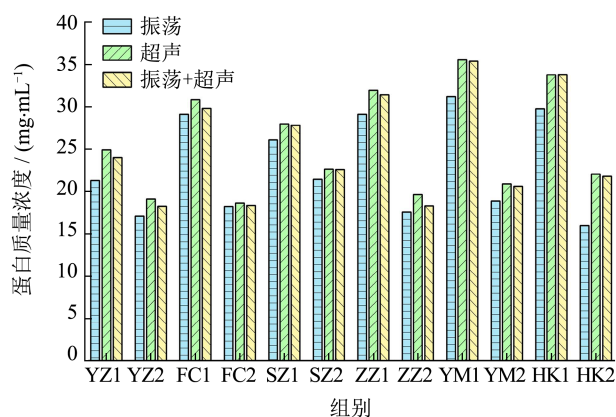


图 5 不同辅助蛋白提取方式对蛋白质量浓度的影响

Fig.5 The influence of different auxiliary protein extraction methods on protein concentration

2.3.2 辅助蛋白提取时间的优化

确定辅助蛋白提取方式为振荡和超声相结合, 对辅助蛋白提取时间进行优化。以 12 份芝麻加工制品为样品, 设置振荡和超声各自处理的不同时间 (5、10、20、30、40 min), 根据提取蛋白的质量浓度确定合适的提取时间。从图 6 可以看出, 部分样品的蛋白质量浓度随着提取时间的延长而不断提高。当振荡和超声各自处理 20、30 和 40 min 时, 多数加工制品粗提液的蛋白质量浓度没有明显差异。为减少蛋白提取时间, 将时间确定为振荡和超声各自处理 20 min。与超声波辅助提取芝麻饼粕中芝麻蛋白的水酶法^[15]相比, 超声提取时间由 60 min 缩短至 20 min。不仅减少了长时间

超声处理对蛋白质结构和目标过敏原蛋白酶解肽段的影响,也有效提高加工制品中芝麻蛋白的得率,便于后续加工制品中芝麻过敏原蛋白质谱灵敏检测方法的建立。

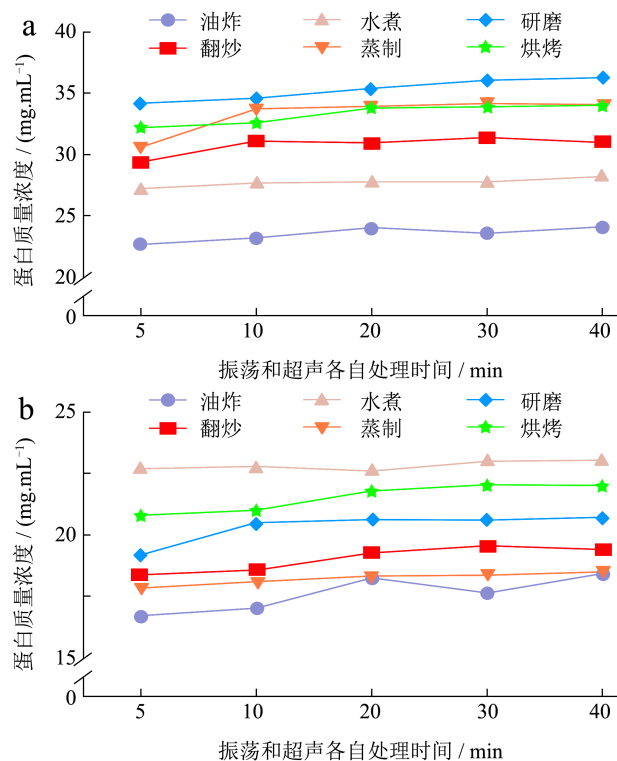


图6 振荡和超声结合不同时间对芝麻制品提取蛋白质量浓度的影响

Fig.6 The effect of combining oscillation and ultrasound at different times on protein concentration extraction from sesame products

注: a 为白芝麻制品; b 为黑芝麻制品。

3 结论

芝麻过敏原的精准识别对标签标识及风险预警有重要意义,液质联用技术为其检测提供有力支撑。前期研究表明,使用不同溶液提取芝麻蛋白会影响质谱检测灵敏度,关乎定量结果的精准度。因此,高效准确的芝麻蛋白提取方法是建立加工食品中芝麻过敏原蛋白质谱检测方法的重要基础。本研究以生芝麻、熟芝麻及实验室制备的芝麻加工制品为样品,根据粗提液的蛋白质量浓度、蛋白分布及质谱鉴定结果,确定含有 7 mol·L⁻¹ 尿素、2 mol·L⁻¹ 硫脲和质量分数 4% CHAPS 的 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲溶液作为蛋白提取液。以 12 份芝麻加工制品为样品,确定振荡和超声结合辅助提取 40 min 的方式,能有效提取加工制品中的芝麻蛋白,质量浓度可达 20 mg·mL⁻¹ 以上。与已有的芝麻蛋白提取研究相比,本研究以芝麻及其加工制

品作为样品,确定的方法更适用于加工制品中芝麻蛋白的提取,具有实际意义。本研究所进行的加工食品中芝麻蛋白的提取方法优化研究可为痕量检测芝麻过敏原的质谱法提供技术支撑,有助于芝麻过敏原标签标识的规范,保护芝麻过敏患者健康。

参考文献

- [1] PI X, PENG Z Y, LIU J F, et al. Sesame allergy: mechanisms, prevalence, allergens, residue detection, effects of processing and cross-reactivity [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 64(10): 2847-2862.
- [2] MA X, WANG Z, ZHENG C, et al. A comprehensive review of bioactive compounds and processing technology of sesame seed [J]. Oil Crop Science, 2022, 7(2): 88-94.
- [3] SEGLA KOFFI DOSSOU S, XU F T, YOU J, et al. Widely targeted metabolome profiling of different colored sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds provides new insight into their antioxidant activities [J]. Food Research International, 2022, 151: 110850.
- [4] 贾斌,王允,尹海燕,等.黑、白芝麻营养成分及品质的差异分析[J].河南农业科学,2020,49(5):69-74.
- [5] 朱晓冬.芝麻高密度遗传图谱构建和种皮颜色QTL分析[D].北京:中国农业科学院,2016.
- [6] 罗自舒,王志坚,周王易,等.不同颜色芝麻营养成分性状遗传变异分析[J].植物遗传资源学报,2023,24(2):365-375.
- [7] ZENG J H, MA F F, ZHAI L G, et al. Recent advance in sesame allergens: influence of food processing and their detection methods [J]. Food Chemistry, 2024, 448: 139058.
- [8] PROTUDJER J L P, ABRAMS E M. Sesame: the new priority allergen? [J]. Jama Network Open, 2019, 2(8): e199149.
- [9] NEMNI A, STERN R, BILLARD-LARUE C, GUIDDIR T. Allergie aux graines : revue de la littérature [J]. Revue Française d'Allergologie, 2021, 61(3): 184-192.
- [10] 王健.江西省预包装休闲食品的预防性过敏原标识调查及定量风险评估[D].南昌:南昌大学,2024.
- [11] AYDOGAN C. Critical review of new advances in food and plant proteomics analyses by nano-LC/MS towards advanced foodomics [J]. Trac Trends in Analytical Chemistry, 2024, 176: 117759.
- [12] LU Y J, JI H, CHEN Y, et al. A systematic review on the recent advances of wheat allergen detection by mass spectrometry: future prospects [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(33): 12324-12340.
- [13] 焦晓波,王高杨,李锦红,等.芝麻渣中蛋白提取方法的比较研究[J].生物技术通报,2021,37(4):273-281.
- [14] 曹培换,张晨霞,刘燕,等.响应面优化氯化胆碱-丙三醇体系提取芝麻蛋白工艺条件[J].中国油脂,2025,50(1):102-108.
- [15] 张淼,文芬,邵雪梅,等.响应面法优化芝麻饼粕中芝麻蛋白的提取工艺[J].粮食与油脂,2020,33(12):49-52.
- [16] 罗婷婷,李晶晶,胡海玥,等.亚麻籽粕蛋白提取工艺优化及蛋白结构和功能特性研究[J].食品工业科技,2025,46(3):258-268.
- [17] MA X L, LI H, ZHANG J K, et al. Comprehensive quantification of

- sesame allergens in processed food using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Control, 2020, 107: 106744.
- [18] ACHOURI A, BOYE J I. Thermal processing, salt and high pressure treatment effects on molecular structure and antigenicity of sesame protein isolate [J]. Food Research International, 2013, 53(1): 240-251.
- [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.
- [20] 房芳,张九凯,马雪婷,等.基于特征肽段的阿胶中异源性物种鉴别[J].食品科学,2019,40(16):267-273.
- [21] JIA H M, ZHOU T J, ZHU H, et al. Quantification of Gly m 5.0101 in soybean and soy products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Molecules, 2019, 24(1): 68.
- [22] HENROTTIN J, PILOLLI R, HUET A C, et al. Optimization of a sample preparation workflow based on UHPLC-MS/MS method for multi-allergen detection in chocolate: an outcome of the ThRAI project [J]. Food Control, 2023, 143: 109256.
- [23] PLANQUE M, AMOULD T, DELAHANUT P, et al. Development of a strategy for the quantification of food allergens in several food products by mass spectrometry in a routine laboratory [J]. Food Chemistry, 2019, 274: 35-45.
- [24] L'HOCINE L, PITRE M. Quantitative and qualitative optimization of allergen extraction from peanut and selected tree nuts [J]. Food Chemistry, 2016, 194: 780-786.
- [25] NELIS J L D, BROADBENT J A, BOSE U, et al. Targeted proteomics for rapid and robust peanut allergen quantification [J]. Food Chemistry, 2022, 383: 132592.
- [26] FAN S F, MA J M, LIU Z, et al. Determination of egg and milk allergen in food products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry based on signature peptides and isotope-labeled internal standard [J]. Food Science and Human Wellness, 2023, 12(3): 728-736.
- [27] STELLA R, SETTE G, MORESSA A, et al. LC-HRMS/MS for the simultaneous determination of four allergens in fish and swine food products [J]. Food Chemistry, 2020, 331: 127276.
- [28] PILOLLI R, VAN POUCKE C, DE ANGELIS E, et al. Discovery based high resolution MS/MS analysis for selection of allergen markers in chocolate and broth powder matrices [J]. Food Chemistry, 2021, 343: 128533.