МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ ИМЕНИ В. М. ГОРБАТОВА» РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН)

На правах рукописи

ХВОСТОВ ДАНИИЛ ВЛАДИСЛАВОВИЧ

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОТЕОТИПИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ ДЛЯ ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА МЫШЕЧНЫХ БЕЛКОВ В МЯСНОЙ ПРОДУКЦИИ MRM МЕТОДОМ

Специальность
05.18.04 – технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научный руководитель: **Вострикова Наталья Леонидовна**
доктор технических наук

Москва – 2021

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ ... 3
ГЛАВА 1. АНАЛИЗ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ ... 11
1.1. Выбор направления исследования ... 11
1.2. История изучения белков ... 15
1.3. Современные методы анализа видоспецифичности мясных продуктов ... 19
1.4. Методы аутентификации пищевых продуктов на основе масс-спектрометрии ... 25
1.5. Протеомные подходы для обнаружения биомаркеров на основе белков и пептидов для профилирования пищевых продуктов ... 33
1.6. Применение масс-спектрометрического анализа на основе белка для проверки подлинности пищевых продуктов (аутентификация) ... 40
1.7. Заключение к литературному обзору ... 47
ГЛАВА 2. ОРГАНИЗАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ... 49
2.1. Организация работы ... 49
2.2. Объекты исследований ... 51
2.3. Реагенты и растворители ... 53
2.4. Методы исследований ... 53
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ ... 62
3.1. Применение аспектов биомоделирования МС параметров протеотипических пептидов ... 62
3.2. Маркерная идентификация пептидов ... 64
3.2.1. Маркерные пептиды говядины для определения состава мясных продуктов ... 64
3.2.2. Маркерные пептиды свинины для определения состава мясных продуктов ... 67
3.2.3. Маркерные пептиды мяса птицы (курица) ... 72
3.2.4. Белковых ингредиентов, применяемых в мясном производстве ... 74
3.3. Проверка селективности протеотипических пептидов свинины по типу ткани ... 76
3.4. Разработка методики содержания мышечной ткани в мясном сырье ... 79
3.4.1. Выбор пар ионов и определение оптимизированных параметров MRM ... 79
3.4.2. Проверка специфичности методики ... 80
3.4.3. Количественная оценка видов мяса ... 83
3.4.4. Протеотипические пептиды видовой идентификации и белковых ингредиентов ... 87
3.5. Экономическая эффективность ... 89
ЗАКЛЮЧЕНИЕ ... 90
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ ... 91
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ ... 94
ПРИЛОЖЕНИЯ ... 112

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Идентификация различных видов животных, используемых в промышленном производстве мясных продуктов не теряет своей актуальности и на сегодняшний день, ввиду возрастающей потребности в мясном белке и увеличением маржинальности перерабатывающих предприятий. Все это приводит к фактам непреднамеренных и/или намеренных практик, вводящих в заблуждение потребителя своими заявления о чистоте и стандартизованном соответствии продукта, которые могут повлиять на здоровье человека [1]. Незаявленные мясные и немясные ингредиенты могут быть источником белков, ответственных за тяжелые реакции и аллергической пищевой непереносимости у потребителей [2,3]. Случайное загрязнение или преднамеренная контаминация мяса разными видами животных и птицы, является глобальной проблемой [4, 5, 6], хотя подлинность продуктов питания и правильная маркировка регламентированы многими законами и правилами (Постановление (ЕС) № 178/2002 Европейского парламента [7], ТР ТС 022/2011 «Пищевая продукция в части ее маркировки»). Поэтому необходима постоянная разработка передовых аналитических методов для эффективного тестирования подлинности и соответствия состава пищевых продуктов.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) в сочетании с различными детекторами масс-спектрометрии (МС), применяемыми в современной протеомике, привела к технологическим разработкам и новым приложениям для рутинных задач. Методы жидкостной хроматографии – масс-спектрометрии на основе протеомики (LC-MS) в последнее время получили все большее распространение в пищевой промышленности, например, для идентификации пептидов, полученных из белка, устойчивых к термической обработке пищевых продуктов и, таким образом, полезных для аутентификации пищевых продуктов.

Идентификация пептидных маркеров является наиболее критическим этапом при разработке новых методов LC-MS/MS, поскольку точность метода

обнаружения факта фальсификации пищевых продуктов будет зависеть от устойчивости, неизменности и уникальности протеотипических пептидов, для вида животных, используемых в мясном производстве. Масс-спектрометрия нового поколения с высоким разрешением (HRMS) позволяет проводить одновременный скрининг неограниченного количества пептидов за одно исследование с высоким разрешением. HRMS все чаще используется для скрининга, идентификации и подтверждения нецелевых и неизвестных пептидов в пищевых продуктах (Fornal и Montowska, 2019, Gavage и соавт., 2020, Jira и Münch, 2019, Li и соавт., 2018, Ma и соавт., 2020, Montowska и Fornal, 2017, Montowska и соавт., 2019, Naveena и соавт., 2017, Pan и соавт., 2018, Pilolli и соавт., 2020, Prandi и соавт., 2019, Ruiz Orduna и соавт., 2017, Sarah и соавт., 2016, Stachniuk и соавт., 2020) [1, 3, 6, 8-19]. Наличие подтвержденных пептидных маркеров, уникально подобранных для всех потребляемых видов, крайне востребовано для обеспечения возможности одновременного обнаружения фальсификации в продукции нескольких видов животных или птицы в одном анализе LC-MS/MS. Для обеспечения высокой точности, надежности и достоверности метода требуется применение более одного пептидного маркера для каждого вида животного или птицы, происходящего по меньшей мере из двух целевых белков, поскольку производство пищевых продуктов подвергается различной технологической обработке, что приводит к различной степени разрушения белка [12]. Кроме того, экзогенные и эндогенные факторы, присутствующие в сложных пищевых матрицах, могут влиять на обнаружение видовых маркеров, требуя для идентификации два или более пептидных маркера, для каждого вида соответственно, для обеспечения специфичности метода LC-MS/MS.

Инструменты протеомики LC-MS/MS использовались для идентификации и характеристики видовых маркеров в различных видах пищевых продуктов и сырья, таких как мясо (Fornal и Montowska, 2019, Li и соавт., 2018, Prandi и соавт., 2019, Sarah и соавт., 2016, Von Bargen и соавт., 2014, Wang и соавт., 2018) [6, 8, 12, 18, 20, 21], сверчки (Montowska и соавт., 2019) [15], рыба (Carrera и соавт., 2012, Sun и соавт., 2019) [22, 23], креветки (Hu и соавт., 2018) [24], осьминог (Guglielmetti и

соавт., 2018) [25], молоко (Mikołajczak и соавт., 2019, Montowska и Fornal, 2019, Qi и соавт., 2019) [2, 26, 27], яйца (Gavage и соавт., 2019, Montowska и Fornal, 2018) [9, 28], орехи (Gavage и соавт., 2020, Ruhland и Klinger, 2019, Van Vlierbergh и соавт., 2020) [10, 29, 30], овощи (Hoffmann и соавт., 2017, Mikołajczak и соавт., 2019, Montowska и Fornal, 2018) [2, 28, 31] и зерновые (Jira и Münch, 2019, Ma и соавт., 2020) [11, 13].

Идентификация пептидных маркеров для близкородственных видов является особенно сложной задачей. Таким образом, для дифференциации близкородственных видов исследователи подбирали пептиды, специфичные для двух видов или для всего семейства таксономий, помимо видоспецифичных пептидов, с целью повышения надежности обнаружения. Например, Prandi и соавт. идентифицировали протеотипический пептид миоглобина HPGDFGADAQGAMTK в качестве уникального маркера для мяса лошадей (лошади и осла) [18]. Fornal и Montowska идентифицировали пептид DAIAQFEASAVGK, полученный из Аполипопротеина A1 (*ApoA-I*), в качестве специфического маркера для уток и гусей [8]. Всесторонние обзоры текущей литературы по масс-спектрометрическому обнаружению уникальных пептидов для одиннадцати видов мяса (курица, утка, гусь, индейка, свинина, говядина, баранина, кролик, буйвол, олень и лошадь) и шести аллергенных пищевых ингредиентов (молоко, яйцо, арахис, соя, фундук и миндаль) были опубликованы в работах авторов Stachniuk и соавт., (2019) и Pilolli и соавт., (2020) [3, 32]. Однако практическое применение вышеуказанных разработок, и доведение их до реализации и каких-либо методических решений не было осуществлено. Поэтому **актуальной задачей** является аутентификация пищевых продуктов, которая тесно связана с качеством и безопасностью пищевых продуктов, поскольку обычная фальсификация может повлиять на общие характеристики пищевых продуктов и может вызвать заболевания пищевого происхождения после потребления.

Степень разработанности темы. Методологической основой диссертационной работы служили труды отечественных ученых: Чернухи И.М., Вострикова Н.Л., Куликовского А.В., Ковалевой М.А., Дзантиева Б.Б.

Подавляющее большинство исследований LC-MS/MS зарубежных ученых на основе белка в мясе было сосредоточено в основном на мясе кур (Claydon и соавт., 2015, Li и соавт., 2018, Montowska и Fornal, 2017, Sentandreu и соавт., 2010, Wang и соавт., 2018) [12, 14, 20, 33, 34], свинине (Fornal и Montowska, 2019, Li и соавт., 2018, Nalazek-Rudnicka и соавт., 2019, Ruiz Orduna и соавт., 2017, Von Bargen и соавт., 2014) [1, 8, 12, 21, 35], говядине (Claydon и соавт., 2015, Fornal и Montowska, 2019, Li и соавт., 2018, Montowska и Fornal, 2017, Montowska и Fornal, 2019, Wang и соавт., 2018) [8, 12, 14, 20, 26, 33], конине (Claydon и соавт., 2015, Von Bargen и соавт., 2014) [21, 33], ягнятине (Li и соавт., 2018, Naveena и соавт., 2017, Prandi и соавт., 2019, Wang и соавт., 2018) [12, 16, 18, 20], крольчатине (Prandi и соавт., 2019, Stachniuk и соавт., 2020) [18, 19], мясе уток (Li и соавт., 2018, Montowska и Fornal, 2017, Montowska и Fornal, 2019, Wang и соавт., 2018) [12, 14, 20, 26] и гусей (Fornal и Montowska, 2019, Montowska и Fornal, 2019) [8, 26], и в меньшей степени на индейке (Prandi и соавт., 2019) [18], буйволятине (Naveena и соавт., 2017) [16] и мясе благородного оленя (Prandi и соавт., 2019) [18].

Отдельные этапы настоящей диссертационной работы выполнены в рамках:

- плана НИОКР ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН «Формирование научного и технологического базиса по выявлению и идентификации ткане- и видоспецифичных веществ белково-пептидной природы в мясных продуктах» (№ 0585-2019-0005) к государственному заданию;

- гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 19-316-90053 «Разработка методологии идентификации протеотипических пептидов маркерных белков при помощи скрининговых MRM методов в биологических матрицах» (2019-2021 г.);

- гранта Российского научного фонда № 16-16-10073 «Изучение механизмов биосинтеза и деградации специфических биологически активных белков и пептидов под действием ферментативного и неферментативного протеолиза тканей *Sus scofa* и *Bos taurus* и разработка на их основе специализированных пищевых продуктов» (2018-2020 г.).

Цель исследований.

Целью работы является разработка методики исследования протеотипических пептидов для аутентификации и определения мультивидов ВЭЖХ-МС/МС методом. Методология охватывает три основных вида мясного сырья, представляющих практический интерес, как основного сырья, используемого в мясной промышленности.

Основные задачи исследования:

- на основе систематизации и анализа имеющихся научных данных с использованием биоинформационных программ подобрать условия масс-спектрометрического детектирования для постановки методики исследования,

- провести маркерную идентификацию мышечной ткани свинины, говядины и мяса птицы (курица), внесенных компонентов в рецептуру вареных колбас не мясного происхождения (сухое молоко, меланж) ВЭЖХ-МС/МС методом и определить наилучшие протеотипические пептиды, которые можно использовать в качестве маркеров в готовых мясных продуктах на примере модельных рецептур, выработанных по общей технологии колбасных изделий вареных,

- установить селективность протеотипических пептидов для мышечной ткани основного мясного сырья (на примере свинины),

- разработать методику идентификации мышечной ткани основного мясного сырья при помощи высокотехнологических средств измерений (высокодостоверного подтверждающего метода исследований пептидома), установить пределы обнаружения и количественного определения содержания мышечной ткани (на примере свинины и говядины).

Научная новизна исследования.

Установлены и научно обоснованы наилучшие протеотипические пептиды мышечной ткани основного мясного сырья (говядина, свинина, курица) и вспомогательных ингредиентов (сухое молоко, меланж) на примере модельных рецептур, изготовленных по общей технологии колбасных изделий вареных.

Получены новые данные по идентификации протеотипических пептидов в разных типах ткани свинины и установлена специфичность маркерных пептидов для мышечной ткани.

Обоснована возможность создания полуколичественной методики для идентификации мышечной ткани основного сырья, используемого в мясной промышленности (свинины и говядина) в многокомпонентной (бесструктурной) матрице при анализе 7 протеотипических пептидов.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Научно обоснованы и подобраны критерии для оценки нахождения наилучших протеотипических пептидов в протеомных исследованиях мясного сырья. Данные могут послужить для пополнения существующих пептидных баз данных по маркерным пептидам.

Разработана мультиплексная методика для детектирования и полуколичественной оценки мышечной ткани основных видов мясного сырья с использованием ВЭЖХ-МС/МС по технологии мониторинга множественных реакций (MRM).

Разработано приложение по идентификации мышечной ткани для методических рекомендаций «Методика измерений массовой доли мясного ингредиента кур в пробах мясной продукции, выработанной по национальным и межгосударственным стандартам (за исключением консервов), методом флуоресценции для детектирования продуктов полимеразной цепной реакции в реальном времени» (№ 241.0067/RA.RU.311866/2021, на 25 стр.).

Методология и методы исследований.

В работе использованы биохимические и протеомные методы исследования белков, включающие в себя спектрофотометрию, жидкостную хроматографию в сочетании с масс-спектрометрией, биоинформационный анализ и статистическую обработку данных.

Основные положения, выносимые на защиту.

Обосновано применение ВЭЖХ-МС/МС метода для нахождения и селективного определения протеотипических пептидов, как маркеров мышечной ткани в мясном сырье и не мясных ингредиентах в модельных рецептурах, выработанных по общей технологии вареных колбасных изделий.

Мультиплексная ВЭЖХ-МС/МС методика полуколичественного определения мышечной ткани по протеотипическим пептидам для основного сырья (свинина, говядина) в многокомпонентной (бесструктурной) матрице MRM методом.

Степень достоверности и апробации работы.

Результаты выполненной работы и их достоверность подтверждается корректным использованием научно-технической литературы, современных экспериментальных методов и методик проведения исследований, полученных результатов и выводов по работе. Научные положения базируются на общедоступных достижениях как фундаментальных, так и прикладных научных дисциплин, связанных с тематикой диссертационной работы.

Результаты диссертационной работы были доложены на X-Евразийском экономическом форуме молодежи «Россия, Азия, Африка, Латинская Америка: экономика взаимного доверия», доклад в финале конкурса «Качество и безопасность товаров как факторы обеспечения конкурентоспособности на внутреннем и внешнем рынках»,17 апреля 2019 г, УрГЭУ; Научно-практической конференции, посвященной 90-летию ВИЖа «Научное обеспечение развития животноводства в Российской Федерации» (23-25 сентября 2019 г.); Международной конференции 2019 (9-й Международный симпозиум по последним достижениям в области анализа пищевых продуктов (RAFA 2019) 5—8 Ноября 2019, Прага, Czech Republic; Международной конференции 2020 ASAS-CSAS-WSASAS Virtual Annual Meeting and Trade Show July 19-23, 2020; Всероссийской с международным участием онлайн-конференции «Современная биотехнология: актуальные вопросы, инновации и достижения» ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет». – Кемерово, 2020; РосБиоТех-2020

XIV международном биотехнологическом Форум-Выставке Москва, 17 - 19 ноября 2020 г.; на XXII Международной научно-практической конференции, посвященной памяти В. М. Горбатова «Пищевые системы. Биобезопасность, технологии и инжиниринг», Москва, 25 ноября 2020 г.

Личное участие соискателя.

Диссертационная работа выполнена соискателем лично и включает анализ научно-технической литературы, выбор и обоснование экспериментальных методов исследований, выполнение эксперимента, обобщение полученных результатов, выводы по работе. Разработано аналитическое приложение в качестве применения скринингового метода в аттестованной методике измерения массовой доли мясного ингредиента кур в пробах мясной продукции. Соавторство по отдельным этапам работы отражено в списке публикаций.

Публикации.

По результатам, изложенным в диссертационной работе, опубликовано 13 печатных работ, в т.ч. 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем работы.

Диссертационная работа включает введение, обзор литературы, характеристику объектов и методов исследования, экспериментальную часть, результаты и анализ данных, экономическую эффективность разработанной методики анализа, выводы, список использованных источников, приложения. Работа содержит 151 страницы, 10 таблиц, 20 рисунков, 4 приложения. Список литературы содержит 152 наименования отечественных, зарубежных авторов и интернет-ресурсов.

ГЛАВА 1. АНАЛИЗ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Выбор направления исследования

Потребители в 21 веке стали более требовательными и разнообразными в плане питания. Если принять во внимание потребление мяса, с одной стороны, увеличивается число людей, переходящих на вегетарианскую диету с широким спектром потребления различных продуктов. С другой стороны, люди, потребляющие продукты животного происхождения, с большей вероятностью будут стремиться к продуктам с улучшенными полезными для здоровья свойствами. Соответственно, рынок продовольственных товаров постоянно расширяется. Мясные продукты в своем составе содержат так же и добавки растительного происхождения, такие как масла, семена, бобовые, растительные экстракты и белковые изоляты, с целью повышения пищевой ценности продукта за счет увеличения содержания пищевых волокон, витаминов, фитостеролов, полифенолов и минералов, а также частичной замены мясожировой фракции на растительно-белково-жировую фракцию для снижения содержания насыщенных жирных кислот и холестерина [36-40]. В результате получается продукт, обогащенный растительными стероидами и станолами, которые оказывают значительное влияние на здоровье человека, т. е. снижают концентрацию холестерина в сыворотке крови, особенно его атерогенной фракции липопротеинов низкой плотности.

Растительные продукты претерпевают множество модификаций для получения аналогов мясных продуктов, например, веганских колбас, котлет, гамбургеров, паштетов и т.д. Для этой цели были показаны в качестве перспективных заменителей животного белка, среди прочего, текстурированный соевый белок; грибы, включая мицелий *Pleurotus sapidus*; клейковина пшеницы; и, совсем недавно, горох, нут и белковые изоляты [41-43]. Ассортимент доступных продуктов питания широк, но самое главное – это всегда гарантия здоровья и безопасности. Эти два постулата напрямую связаны с тем, является ли состав

пищевого продукта, заявленного производителем, подлинным, т. е. содержит ли он нежелательные ингредиенты или более дешевые заменители.

Фальсификация продуктов питания является критической проблемой в области безопасности и качества пищевых продуктов. Учитывая высокую добавленную стоимость и сложность матрицы, обработанные мясные продукты относятся к числу наиболее подверженных фальсификации. Несмотря на все усилия официальных контрольных органов, направленные на противодействие этим фальсификациям, необъявленная замена видов мяса более дешевыми по-прежнему широко распространена. Продовольственная фальсификация – это широкий термин, используемый для обозначения любых преднамеренных нарушений законодательства в агропродовольственных цепочках. Эти действия, часто мотивированные экономической выгодой, включают преднамеренную замену, добавление, подделку или искажение пищевых продуктов, пищевых ингредиентов или упаковки пищевых продуктов. Дополнительные критерии для определения фальсификации влекут за собой некоторые формы обмана потребителей, включая использование ложной или вводящей в заблуждение маркировки. На качество или природу продукта могут повлиять такие факторы, как объявление других видов, сортов или происхождения для снижения затрат на импорт или ложные заявления о производственных процессах.

Фальсификация продуктов питания практикуется с древности, о чем свидетельствуют находки поддельных римских печатей на амфорах, содержащих поддельное оливковое масло и вино. В настоящее время необходимость конкурировать с мощными предприятиями и производителями на глобализированном рынке является одной из движущих сил фальсификации с продуктами питания, наряду с растущей сложностью глобальной системы снабжения продовольствием, которая существенно увеличила расстояние между местом производства продуктов питания и потребителями [44, 45]. Таким образом, поскольку сырье поступает из нескольких стран, становится все труднее отследить потенциальные источники непреднамеренного загрязнения. Кроме того, преднамеренную фальсификацию нелегко обнаружить в продуктах с высокой

степенью технологической переработки из-за сложных ингредиентов, часто предоставляемых несколькими поставщиками.

Системы маркировки пищевых продуктов постоянно развиваются параллельно с законодательством, направленным на поддержку и гарантию качества и подлинности пищевых продуктов. Действительно, помимо присущих продуктам питания свойств, некоторые «дескрипторы ценности», такие как географическое происхождение, методы производства, требования безопасности и стандарты экологического благополучия, все чаще используются в качестве показателей качества. В Европе сертификация и защита происхождения являются одним из основных вопросов подлинности пищевых продуктов. В частности, эти законодательные акты включают защищённое наименование места происхождения (PDO), которое указывает на продукты, полностью произведенные в определенной географической зоне. Кроме того, этикетка с защищенным географическим указанием (PGI) соотносит продукты с географическим районом, в котором произошел по крайней мере один этап производства, в то время как этикетка с гарантией традиционных фирменных блюд (TSG) обеспечивает режим защиты традиционных продуктов питания. Кроме того, дополнительные условия качества недавно были определены как новые типы схем обеспечения качества для защиты репутации региональных продуктов питания и поощрения передовой практики в сельской и сельскохозяйственной деятельности. Некоторые из них были определены как «горный продукт» и «продукт островного земледелия», чтобы усилить восприятие потребителями особого качества, приписываемого горному и островному продукту. Проблема фальсификации пищевых продуктов является распространенной и в последнее время была описана во многих публикациях [46-49]. Нередко бывает так, что состав продукта не соответствует тому, что указано на этикетке, и, следовательно, ожиданиям потребителя. Например, в ходе операции Opson, которая проводилась совместно Европолом и Интерполом с декабря 2018 по апрель 2019 года, было изъято контрафактных и некачественных продуктов питания и напитков на сумму более 100 миллионов долларов [50]. Поэтому регулярный контроль состава пищи имеет первостепенное значение.

Следовательно, по-прежнему существует необходимость в разработке новых, надежных и чувствительных методов, способных одновременно обнаруживать и идентифицировать различные ингредиенты животного и растительного происхождения в обработанных пищевых продуктах, а также оценить их преднамеренное или случайное присутствие, с целью поддержания стандартов качества и выполнения требований законодательства в пищевой промышленности [51, 52].

Для аутентификации пищевых продуктов было разработано множество специализированных аналитических методов, и аналитический прогресс в этой области был недавно обобщен в нескольких статьях, посвященных применению нецелевых и целевых методов или неразрушающих, или разрушающих методов, включая спектроскопические методы и омические подходы, основанные на анализе метаболитов, белков и ДНК, в некоторых случаях также в сочетании с хемометрией [32, 48, 53-57]. Среди них протеомные методы важны в исследованиях подлинности из-за как многовидового, так и внутривидового обнаружения компонентов, полученных от одного и того же вида. Основываясь на специфических белках и пептидных маркерах, можно уверенно проверять ингредиенты, заявленные производителем на этикетке, идентифицировать аллергенные белки и успешно демонстрировать даже незначительные нарушения в продукте, особенно в случае продуктов с высокой степенью переработки.

В последнее время все больше внимания уделяется разработке метода на основе жидкостной хроматографии с масс-анализаторами высокого разрешения и тандемными масс-анализаторами низкого разрешения, позволяющими осуществлять MRM, что представляет собой подход, основанный на белковом профилировании. Внедрено несколько методов на основе масс-спектрометрии для одновременного обнаружения видов мяса и/или растительных ингредиентов, например, восемь видов- свинина, говядина, баранина, курица, утка, соя, арахис и горох контролировались в мясных продуктах на основе видоспецифичных пептидных маркеров [12]; был разработан качественный LC-MS метод с технологией MRM для мониторинга мяса утки, гуся и курицы одновременно с

говядиной и свининой в мясных продуктах высокой степени переработки [8]; сообщалось о методах идентификации продуктов крови свиней, крупного рогатого скота, овец, курицы и утки с использованием пептидных маркеров [58] и для одновременного обнаружения белков люпина, гороха и сои в мясных продуктах [31]; и, наконец, пептидные маркеры для одновременного обнаружения курицы, утки, гуся, цесарки, страуса, фазана, голубя, перепела и индейки были протестированы в сыром и разогретом мясе [59]. Кроме того, были разработаны методы направленной жидкостной хроматографии–тандемной масс-спектрометрии (LC-MS/MS) для мультиплексного обнаружения 14 основных аллергенов в различных пищевых продуктах и одновременного присутствия молока, яиц, ракообразных и сои в продуктах из рыбы и свинины [60, 61]. Важность надежных аналитических методологий неоспорима, поскольку только с помощью правильно проведенного анализа можно определить, является ли данная пища подлинной, безопасной и соответствует ожиданиям потребителей, независимо от диетических предпочтений.

1.2. История изучения белков

Первым основоположником изучения белков по праву считается французский химик Антуан Фуркруа [62]. В XVIII веке учеными и А. Фуркруа проводились многочисленные исследования веществ белковой природы таких, как белки крови (фибрин, альбумин) и яиц. Данные соединения были выделены в отдельный класс молекул. Было выявлено, что под действием нагревания или кислот белки способны коагулировать (денатурировать). Параллельно с открытием данных свойств, в 1728 году, итальянский ученый Якопо Беккари впервые получил белок из пшеничной муки в виде клейковины (глютен). Эти события стали основополагающими в истории изучения состава белков.

Уже в следующем столетии, в 1820 году, французский химик Анри Браконно открыл в продуктах гидролиза белков аминокислоты лейцин и глицин [62]. Спустя 16 лет после этого появилась первая гипотеза о химическом строении белков. Следуя данной модели, предполагалось, что все белки имеют похожую структуру

и эмпирическую формулу. Использую теорию радикалов, химиком голландского происхождения, Герритом Мулдером была предложена эта модель [63]. Данная формула представляла $C_{40}H_{62}N_{10}O_{12}$, что соответствовало составу минимальной структуры единицы белка. А всего через 2 года, в 1838 году, белкам было дано название – протеины на основании универсального принципа построения белковых веществ. Его предложил шведский химик Якоб Берцелиус [64]. Теория белка имела и противников и подвергалась сильной критике. Однако по мере получения новых знаний о структуре белков, теория белка считалась общепризнанной до конца 1850-х.

Большая часть аминокислотного состава белковых молекул была исследована к концу XX века. В конце 1880-х годов наш соотечественник биохимик Александр Данилевский обнаружил в молекуле белка присутствие пептидных групп, выраженных формулой CO - NH [65]. Из его работ возникла гипотеза о строении белков. Она получила название «теории элементарных рядов». На протяжении последующих 20 лет научное сообщество плавно подходило к идее о том, что все белки являются аминокислотами, составленными в определенном порядке [66]. Подтверждение выдвинутой теории А. Косселя было доказано в эксперименте немецкого химика Эмилема Фишера в начале XX века. В 1902 году он предложили пептидную теорию строения белка. В промежутке от 1899 до 1908 годов Э. Фишер с сотрудниками синтезировали в лаборатории первые пептиды. Также была в первые расшифрована аминокислотная последовательность белка и дано объяснение такого явления, как протеолиз [67].

В 1926 году было проведено исследование с ферментом уреазой американской лабораторией с биохимиком Джеймсом Самнером. Было доказано что семейство ферментов относиться к белкам [68]. Это стало первым шагом к пониманию важности роли, играемой белками в живых организмах.

Только 55 лет спустя после становления теории А. Косселя об аминокислотном строении белков началась эпоха изучения конформационного устройства белков. В период конце 1940-х начале 50-х годов английский биохимик Фредерик Сенгер, единственный ученый, получивший две нобелевские премии по

химии трудился над новым методом в области анализа белковых молекул (секвенирование). Используя такой метод, ученый смог определить аминокислотные последовательности двух цепей гормона инсулина. В ходе эксперимента была установлена линейная структура белка, состоящего из аминокислот, а не из коллоидов или разветвленных цепей [69].

Физиком из Англии Уильямом Астбери в 1933 году была высказана идея о том, что вторичная структура белков формируется в результате образования водородных связей между аминокислотными остатками. Но первым учёным, который смог успешно предсказать способность белков образовывать вторичную структуру, считается американский химик Лайнус Полинг [70]. В 1951 году Л. Полинг и Роберт Кори разработали модель вторичной структуры белка и назвали ее α-спиралью [71]. В том же году датский биохимик Кай Линдерстрём-Ланг ввел понятие существования трех уровней организации белковой молекулы: первичной, вторичной и третичной [63]. После этих открытий началась стремительная эпоха исследования структурной организации белков.

В конце 1950-х и начале 1960-х годов были показаны первые в истории пространственные структуры молекул белков, полученные методом рентгеноструктурного анализа. В данные отрезки истории английский биохимик Джон Кендрью (1958) и австрийский биохимик Макс Перуц (1959) расшифровали третичную структуру белков – миоглобина и гемоглобина [72, 73]. Позднее, в 1980-х годах, используя новый подход в области ядерного магнитного резонанса, были открыты новые белковые структуры.

С развитием научного прогресса изучались сотни и тысячи белков отдельных клеток, тканей и органов живых объектов, их посттрансляционные модификации. Всеми этими направлениями сейчас занимается протеомика, новый раздел в биохимии. Конечно, с развитием технической отрасли изучение данной темы значительно упрощается, однако многие ответы еще скрыты от человека. В основном человечество нацелено на изучение структур белковых молекул и рецепторов, с которыми они взаимодействуют, что даст нам ответы на вопросы о внутренних процессах.

Научные работы, посвященные изучению этого высокомолекулярного органического вещества, активно продолжается и в наши дни. А на базе их результатов строятся карты биологических процессов, создаются специфические терапевтические агенты и многое другое. На сегодняшний день существует огромное количество баз данных, посвященных характеристикам белковых молекул и их структур. В мировом научном сообществе представлены так же объединения некоторых баз данных, таких как, европейский и японский банки данных о белках, совмещённые с базами, хранящими информацию касательно структурной биоинформатики и магнитно-резонансных данных, под куполом мирового банка данных о белках, который содержит информацию о более чем 100 тысячах структур белков [74].

Способы выделения и очистки белков

Выделение белка из тканей с прочным внеклеточным матриксом (например, биопсийными образцами, венозными тканями, хрящом, кожей) часто достигается в лабораторных условиях путем ударного распыления в жидком азоте. Образцы замораживают в жидком азоте и затем подвергают удару или механическому измельчению. Поскольку вода в образцах становится очень хрупкой при этой температуре, образцы часто сводятся к набору мелких фрагментов, которые затем могут быть растворены для экстракции белка. Для этой цели иногда используются устройства из нержавеющей стали, известные как тканевые пульверизаторы [75]. Преимущества этих устройств, включают в себя высокие уровни экстракции белка из небольших ценных образцов, недостатком является низкоуровневое перекрестное загрязнение.

Очистка белков включает в себя следующие методы: изоляция белков; хроматографические методы: ионный обмен, размер-эксклюзионная хроматография (или гель-фильтрация), аффинная хроматография; выделение и солюбилизация белков; концентрация белковых растворов; электрофорез в геле: электрофорез в геле в условиях денатурации, гель-электрофорез в условиях отсутствия денатурации, 2D-гель-электрофорез; электрофокусирование.

Способы количественной оценки белков

Значительно малый размер макромолекул белка делает идентификацию и количественную оценку неизвестных образцов белка особенно сложными. Для упрощения процесса были разработаны несколько надежных методов количественного определения белка. Эти методы включают *Warburg-Christian, Lowry Assay* и *Bradford Assay* (все они основаны на свойствах поглощения макромолекул).

Метод Бредфорда представляет способ определения белка, который включает связывание кумасси G-250 с белком [76]. Связывание красителя с белком вызывает сдвиг максимума поглощения красителя с 465 до 595 нм, и это увеличение поглощения наблюдают при 595 нм. Этот анализ очень воспроизводимый и быстрый. Процесс связывания красителя занимает примерно 2 минуты с хорошей стабильностью цвета в течение 1 часа. Существует небольшое количество или отсутствие фона от катионов, таких как натрий или калий, или от углеводов, таких как сахароза. Небольшое количество цвета развивается в присутствии сильнощелочных буферных агентов, но анализ может выполняться точно с помощью правильного контроля буфера. Единственными компонентами, которые, по-видимому, дают чрезмерный мешающий цвет в анализе, являются относительно большие количества детергентов, таких как додецилсульфат натрия, Triton X-100 и коммерческие моющие средства для посуды. Интерференция небольшими количествами моющего средства может быть устранена с помощью надлежащего контроля.

1.3. Современные методы анализа видоспецифичности мясных продуктов

Аналитические инструменты для оценки подлинности мяса постоянно развиваются в ответ на новые сложные вопросы и охватывают широкий спектр методов. Фальсификация с пищевыми продуктами, скорее всего, происходит в обработанных пищевых продуктах, где присутствует фарш (предотвращая визуальное распознавание). В этих термически обработанных пищевых продуктах

могут возникнуть некоторые проблемы с обнаружением из-за мешающих соединений, разложения нуклеиновых кислот и белков [77, 78]. Явления гидролиза и денатурации особенно суровы в тех продуктах питания, которые также имеют кислотный pH (например, лимонный сок или уксус) и / или подвергаются сильным тепловым воздействиям (например, при длительной варке или стерилизации). Таким образом, для самых сложных пищевых матриц, имеющих различные ингредиенты, смешанные вместе или подвергнутые жесткой термической обработке, необходимость разработки в надежных, чувствительных и селективных методах все еще остается проблемой [79].

Термостабильные пептиды – это короткие фрагменты первичной структуры белка, обычно состоящие из 5–20 аминокислотных остатков, которые устойчивы к тепловой обработке пищевых продуктов и могут использоваться в качестве видоспецифичных маркеров (протеотипические пептиды) для идентификации мяса.

1.3.1. Генетические методы

При замене видов мяса, различия в генетических материалах можно обнаружить с помощью генетических подходов, таких как ДНК-гибридизация и полимеразная цепная реакция (ПЦР) [80]. Штрихкодирование ДНК является одним из наиболее многообещающих генетических методов для аутентификации пищевых продуктов в обработанном мясе, позволяя распознавать с вероятностью более 68,0% успешных видов мяса путем секвенирования гена-мишени (ген субъединицы I цитохром-с-оксидаза) [81]. Другой инновационный метод основан на разработке геносенсоров на основе хемилюминесцентного оптического волокна, который уже успешно применяется для обнаружения свинины в измельченных сырых мясных смесях до 1% (мас. %) [82]. Несмотря на то, что это мощный инструмент для идентификации видов животных, методы ДНК могут легко потерпеть неудачу в сильно переработанных пищевых матрицах из-за деградации ДНК.

1.3.2. Иммуноаналитические методы анализа

Основным иммуноаналитическим методом, интенсивно используемым в настоящее время для установления видовой принадлежности мясного сырья и готовых мясных продуктов, является иммуноферментный анализ (ИФА). Проблемам аутентификации различных пищевых продуктов с помощью ИФА посвящен обзор Asencio и соавт [83]. Методы ИФА активно применялись для выявления мяса различных видов животных с использованием антител, полученных против мышечных и сывороточных животных белков или термостабильных белков [84-87]. Проведены как качественные исследования, направленные на определение происхождения мяса млекопитающих в готовой мясной продукции [88, 89], так и количественная оценка содержания в продукции мяса того или иного вида. Так, в работе Martin и соавт. проведена количественная оценка фальсификата свинины в сыром мясном фарше [85]. Chen и соавт. получили моноклональные антитела против свиного термостабильного мышечного белка и реализовали количественный анализ содержания свинины в сыром и термически обработанном мясе и пищевых продуктах [90]. Предел обнаружения составлял 0,5–0,05% (мас. %) свинины в сборных мясных смесях. Ali и соавт. разработали анализ для обнаружения свинины в халяльной мясной продукции, позволяющий определять содержание свинины как в сыром, так и в обработанном виде [91]. Ученые определяли содержание говядины в обработанных пищевых продуктах методом «сэндвич»-ИФА, используя моноклональные антитела против денатурированного бычьего миоглобина и уникальной аминокислотной последовательности, характерной для данного белка [92]. Кроме возможности определения говядины независимо от условий обработки мясной продукции, разработанный анализ оказался специфичным в отношении пород коров и не проявлял перекрестной реактивности в отношении белков свинины, курятины, коровьего молока, яиц, пшеницы и арахиса. В частности, специальные модификации ИФА позволили детектировать в сырых мясопродуктах до 0,1% (мас. %) примесей мяса осла в конине, до 0,1% (мас. %) примесей мяса козы в баранине и 1% (мас. %) примесей мяса буйвола в говядине [90]. В недавней работе авторов

настоящей заявки показана эффективность использования мышечного белка тропонина в качестве биомаркера, позволяющего с помощью ИФА дифференцировать мясо млекопитающих и птиц, тем самым количественно характеризуя состав мясопродуктов [93].

Другой вид иммуноаналитической детекции, применяемый в настоящее время для обнаружения самого широкого круга объектов – иммунохроматография – практически не используется в целях пищевой идентификации мясного сырья в настоящее время, хотя и характеризуется рядом неоспоримых достоинств: экспрессность, возможность проведения анализа во внелабораторных условиях, отсутствие специального оборудования и т.д. К немногочисленным работам, опубликованным по данной тематике, относится исследование Masiri и соавт., разработавших ИХА для обнаружения остатков свинины в сыром, вареном мясе и желатине с пределами обнаружения 0,01%, 1,0% и 2,5%, соответственно [94]. Тест-система продемонстрировала высокую специфичность – перекрестная реактивность с мясом курицы, индейки и козы, кониной, говядиной, бараниной отсутствовала. Сравнение разработанной системы с коммерческим ИФА-набором и методом ПЦР показало, что чувствительность определения в ИХА была выше. Кроме того, ИХА характеризовался высокой экспрессностью – проведение анализа осуществлялось в течение 35 мин. Rao и соавт. изучали применимость коммерческого ИХА компании «Neogen Corporation» для обнаружения мышечной ткани говядины и баранины в сельскохозяйственных кормах [95]. Тест-система позволяла быстро (в течение 20 мин) определять указанные компоненты с пределом обнаружения 0,5%.

В настоящее время на рынке представлены коммерческие наборы таких производителей, как Strategic Diagnostics, Inc., Tepnel, Neogen Corporation, Eurofins и ELISA Technologies, Inc. К ним относятся наборы для проведения как ИФА (для количественного анализа), так и иммунохроматографического анализа, ИХА (для качественной детекции) с целью видовой идентификации сырой и термически обработанной мясной продукции. Как показано, оба вида иммуноаналитических систем обеспечивают быстрый, надежный и экономичный скрининг при

проведении видовой идентификации мясных изделий [96]. В некоторые мясные изделия для обеспечения требуемых пищевых и функциональных качеств добавляют белки неживотного происхождения, например, соевый. Добавление в мясную продукцию дешевых ингредиентов является одной из самых распространенных форм фальсификации и представляет потенциальную опасность для здоровья людей, страдающих аллергией к соевому белку. ИФА является удобным методом для идентификации таких добавок. Cota и соавт. получили поликлональные антисыворотки против белков соевой муки и разработали количественный иммуноферментный метод для оценки фальсификаций такого рода в мясной продукции [97]. Macedo-Silva и соавт. определяли соевые белки в гамбургерах, приготовленных из говядины, курятины и свинины [89]. Авторы получили поликлональные антитела против соответствующих белков и провели количественную оценку соевого белка в данных мясных продуктах с помощью ИФА. Koppelman и соавт. получили поликлональные антитела к белкам сои и разработали «сэндвич»-ИФА для количественного определения соевых ингредиентов в различных мясных продуктах [98]. Предел обнаружения составлял 1 ppm. Компании Neogen Corporation, Zeu Inmunotec, ELISA Systems и Tepnel производят иммунохимические диагностические наборы для быстрого обнаружения и определения количества соевых белков в пищевых продуктах. Иммунохимические методы могут использоваться для выявления в мясных продуктах различных типов тканей одного и того же вида [83], что в ряде случаев имеет большое значение для потребителей. Так, например, употребление в пищу свиных и говяжьих почек представляется гораздо более опасным, чем употребление мяса с точки зрения развития тяжелых аллергических реакций [99].

Тем не менее, несмотря на значительный интерес, проявляемый специалистами по отношению к иммунохимическим методам контроля компонентов мясопродуктов, данные методы анализа занимают на сегодняшний день относительно небольшое место в арсенале средств контроля мясопродуктов и решают лишь часть задач. Так, при наличии ряда разработок по выявлению добавок свинины (контроль халяльной пищи) для других мясных источников,

используемых для замены необходимых высококачественных компонентов, специфические аналитические методы отсутствуют. Внелабораторный контроль располагает лишь ограниченным рядом коммерчески доступных иммунохроматографических систем импортного производства. В ряде случаев иммунохимические методы рассматриваются лишь как средство качественного контроля, а не количественной оценки содержания компонентов. Возможности иммунохроматографии с мультипороговой детекцией (полуколичественный анализ) и с видеоцифровой регистрацией (количественный анализ) на данный момент не используются применительно к контролю мясопродуктов. Лишь для немногих иммунохимических разработок проведено их сопоставление с альтернативными аналитическими методами и установлены статистически доказательные характеристики достоверности детекции и точности количественного анализа. Не проработан вопрос об оптимальном сочетании скрининговых методов для широкого первичного тестирования (в качестве которых могут использоваться именно иммунохимические методы) и подтверждающих методов лабораторного анализа. В любом случае, эти методы также страдают во многих случаях ложным срабатыванием и ложно отрицательным результатом в сильно переработанных пищевых продуктах, и их точность, как правило, зависит от конкретного продукта.

Методы молекулярно-генетического анализа в последние годы начали применяться для видовой идентификации мясного сырья. Однако их продвижение в практику ограничивает необходимость специализированного оборудования и квалифицированного персонала для проведения ПЦР-диагностики и других видов молекулярно-генетического анализа. В этой связи наиболее перспективным подходом представляется проведение распознавания специфических участков ДНК в ходе мембранного хроматографического анализа на тест-полосках, аналогичного иммунохроматографии. Возможности такой интеграции демонстрируют единичные публикации 2017-2018 гг., однако ряд методических вопросов требует дополнительного решения, чтобы на основании этих принципов проводить доказательную видовую идентификацию всех основных видов мясного

сырья. В нескольких работах были разработаны системы для детекции различных видов мясного сырья в мясопродуктах [85, 100]. После ПЦР амплификации с праймерами, специфичными для участков различных генов (цитохрома *b*, бета-актин и др.), полученная ДНК гибридизовалась с мечеными олигонуклеотидными зондами, которые детектировались на тест полосках с выявлением до 0,01% мяса целевых животных. В работе Tao Feng и соавт. было показано применение изотермической ПЦР амплификации участка гена цитохрома b овцы с последующей детекцией меченых ампликонов на тест-полосках [101]. Данный подход не требует гибридизации с зондом, протекает в изотермических условиях и позволяет детектировать до 1% целевого источника мяса (баранины) в мясопродуктах.

1.4. Методы аутентификации пищевых продуктов на основе масс-спектрометрии

Несмотря на то, что традиционные методы широко используются для идентификации пищевых продуктов, инновационные аналитические методы, основанные на молекулярных маркерах, в настоящее время являются одними из наиболее надежных методик определения подлинности пищевых продуктов. Из-за внутренних преимуществ и недостатков каждого аналитического подхода для каждого приложения следует выбирать наиболее подходящий метод аутентификации пищевых продуктов, чтобы отличать оригинальные пищевые продукты от неоригинальных аналогов.

В этом тематическом разделе сделан основной акцент на подходах, основанных на масс-спектрометрии (МС) с ионизацией электрораспылением (ESI) и лазерной десорбционной ионизацией с матрицей (MALDI), и соответствующих хроматографических методологиях, применяемых для анализа белков/пептидов в качестве маркеров для аутентификации пищевых продуктов. Также рассмотрен краткий обзор других современных приборов для масс-спектроскопии, используемых в настоящее время для анализа пищевых продуктов.

1.4.1. Обзор хроматографических подходов при анализе пищевых продуктов

Традиционные хроматографические методы использовались для аутентификации и отслеживания пищевых продуктов для получения быстрой и надежной идентификации или количественной оценки белков и пептидов в сложных пищевых матрицах [57, 102]. Эти подходы являются сложными из-за высокого динамического диапазона, сложности и неоднородности соединений в пищевых матрицах. Тем не менее, несмотря на общую химическую сложность пищевых продуктов, принцип хроматографического разделения адсорбции и/или разделения молекул между подвижной и неподвижной фазой оказался выгодным для получения уникальных молекулярных «отпечатков пальцев» (англ. *fingerprinting*), полезных для дифференциации и аутентификации пищевых продуктов. Хроматографические методы могут быть классифицированы в соответствии со свойствами неподвижной и подвижной фаз, упаковкой неподвижной фазы или движущими силами разделения. Газовая хроматография (ГХ) использует разделение, опосредованное твердой стационарной фазой и подвижной газовой фазой. В этом методе введение образца в хроматографическую систему в основном отвечает за разрешение в зависимости от конкретной системы впрыска (т. е. впрыск с разделением/без разделения, на колонке, в пространстве). В системах высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) насос высокого давления подает жидкую подвижную фазу через колонку, заполненную твердой неподвижной фазой, в которой соединения разделяются на основе их заряда (ионообменная хроматография), молекулярной массы (эксклюзионная хроматография) или полярности (Обращённо-фазовая хроматография).

Более поздняя эволюция ВЭЖХ представлена аналитическими системами жидкостной хроматографии сверхвысокой производительности (UPLC). Несмотря на то, что метод UPLC основан на тех же принципах ВЭЖХ, он обеспечивает расширенные возможности разделения за счет существенного уменьшения диаметра частиц материала колонки менее 2 мкм. По сравнению с традиционной ВЭЖХ, разделение и количественное определение в UPLC выполняются при более

высоких давлениях (до 100 МПа), что улучшает разрешение и чувствительность анализа при одновременном сокращении времени разделения и расхода растворителя. Основываясь на этих преимуществах, использование систем UPLC становится все более распространенным, позволяя быстро анализировать пищевые матрицы даже в контексте аутентификации продуктов питания [103]. Кроме того, были также разработаны системы многомерной жидкостной хроматографии (LC/LC) для улучшения разделения соединений из очень сложных пищевых матриц [104].

Хроматографические системы могут быть соединены с различными типами детекторов. Детекторы теплопроводности и ионизации пламени обычно интегрируются с газовой хроматографией (ГХ), в то время как детекторы поглощения ультрафиолетового/видимого света, диодные матрицы и электрохимические детекторы обычно связаны с ВЭЖХ. Тем не менее, соединение масс-спектрометров с хроматографическими методами обеспечивает непревзойденную чувствительность, воспроизводимость и специфичность по сравнению с другими детекторами. В анализе пищевых продуктов наиболее популярны переносные платформы на основе ВЭЖХ-МС и ГХ-МС, также учитывая их высокую пропускную способность и возможности автоматизации [105, 106]. Что касается применений, в то время как ГХ-МС является основным методом, используемым для анализа летучих фракций пищевых продуктов, органических загрязнителей и жиров, LC-MS в основном используется для анализа пищевых белков, пептидов и углеводов. Santos и Oliveira провели тщательный обзор нескольких недавних приложений в области аутентификации пищевых продуктов с использованием методов ВЭЖХ и ГХ, отдельно или в сочетании с MS [107].

1.4.2. Масс-спектрометрические приборы для анализа пищевых белков и пептидов

Масс-спектрометрия – это аналитический метод, который может предоставить как качественную, так и количественную информацию о пищевых

белках и пептидах, которые ионизируются и сортируются на основе их соотношения массы/заряда (m/z). Учитывая его высокую воспроизводимость, специфичность, чувствительность и высокую пропускную способность, МС становится мощным инструментом в исследованиях пищевых продуктов [108, 109]. Приборы для масс-спектрометрии состоят из трех частей: источника ионов, масс - анализатора и детектора. Источник ионов отвечает за ионизацию молекул в жидкой, газовой или высушенной форме. Полученные ионы затем сортируются и разделяются электрическими и/или магнитными полями в соответствии с их массой и зарядом в масс-анализаторе. Среди методов ионизации в качестве методов выбора для анализа пищевых белков и пептидов эволюционировали так называемые методы «мягкой ионизации», такие как ESI и MALDI, характеризующиеся высокой чувствительностью при ионизации с минимальной фрагментацией в источнике.

В источниках MALDI образцы смешивают с подходящими матричными растворами и помещают на пластину из нержавеющей стали. При испарении растворителей матрица и молекулы совместно кристаллизуются. Синапиновая кислота и α-циано-4-гидроксикоричная кислота являются хорошо известными подходящими матрицами для анализа MALDI-MS белков и пептидов. Во время анализа образцы облучаются лазерным лучом (обычно азотным лазером с длиной волны 337 нм), энергия которого в основном поглощается матрицей, которая защищает биомолекулы, предотвращая их фрагментацию. После этого ионы матрицы передают энергию молекулам образца, вызывая их десорбцию. Полученные низкозарядные протонированные/депротонированные ионы впоследствии ускоряются электрическим полем и разделяются на основе их соотношения масса/заряд (m/z), обычно с использованием времяпролётного масс-анализатор (TOF).

В ESI к жидкости, протекающей через эмиттер (обычно стеклянный или металлический капилляр), прикладывается высокое напряжение. Заряженные капли образуются на выходе наконечника электрораспыления в процессе десольватации, приводимого в действие потоком газа (N_2) и капиллярным нагревом

(100-300 $°C$). Полученные многократно протонированные ионы затем фокусируются в области анализатора масс-спектрометра. Источники ESI являются наиболее чувствительными, прочными и надежными для изучения на фемто-молярных уровнях в нескольких микролитровых объемах образцов энергонезависимых и термически лабильных биомолекул, которые не реагируют на анализы другими традиционными методами МС.

Масс-анализаторы можно разделить на квадрупольные, ионные ловушки (IT) и TOF. Квадруполь состоит из четырех цилиндрических стержней, параллельных друг другу с приложенными колебательными электрическими полями, в которых ионы разделяются на основе стабильности их траекторий в стержнях. При заданном соотношении напряжений только ионы определенного соотношения m/z достигнут детектора. Другие ионы с нестабильными траекториями будут сталкиваться со стержнями. Линейный ряд из трех квадруполей известен как трехквадрупольный (QqQ) масс-анализатор. Первый (Q1) и третий (Q3) квадруполи действуют как массовые фильтры, а средний (Q2) квадруполь обычно используется в качестве ячейки для соударений. В частности, этот масс-анализатор широко используется главным образом для проведения количественных определений, связанных с вопросами безопасности и качества пищевых продуктов [110].

Масс-анализаторы с IT работают путем хранения ионов в ловушке и управления ими с помощью постоянного тока и радиочастотных электрических полей в серии синхронизированных событий. Среди масс-анализаторов на основе IT можем отличить «динамические» ловушки (т. е. 3D IT) от «статических» ловушек (т. е. квадрупольных линейных ловушек, LTQ или ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье, FT-ICR). В 3D IT ионы динамически хранятся в трехмерном квадруполе, в котором можно сканировать радиочастотный и постоянный потенциалы для последовательного выброса m/z из ловушки в детектор. В LTQ ионы ограничены в радиальном направлении двумерным радиочастотным полем и в осевом направлении остановочными потенциалами, приложенными к концевым электродам. В масс-анализаторах FT-ICR ионы

движутся по круговой траектории в магнитном поле. Циклотронная частота кругового движения иона зависит от массы. Измеряя частоту циклотрона, можно определить массу иона. Более поздняя эволюция ионных ловушек включает в себя анализатор Orbitrap с высоким разрешением, в котором ионы электростатически улавливаются на орбите вокруг центрального веретенообразного электрода. Электрод ограничивает ионы таким образом, чтобы они вращались вокруг центрального электрода и колебались взад и вперед вдоль длинной оси центрального электрода. Ток изображения от захваченных ионов регистрируется и преобразуется в масс-спектр с использованием преобразования Фурье частотного сигнала.

Различные анализаторы также объединяются в гибридные приборы MS/MS, обычно обладающие более высокой разрешающей способностью и точностью измерений по сравнению с одиночными приборами анализаторов. Например, приборы LTQ-Orbitrap предлагают широкий спектр возможностей для фрагментации за счет подключения ячейки диссоциации при столкновении с более высокой энергией (HCD) к C-ловушке [111, 112].

Ионы, разделенные различными типами анализаторов, в конце концов достигают детекторов, обычно электронных умножителей или микроканальных пластин, которые регистрируют заряд или ток. Результаты затем отображаются в виде спектров путем построения графика относительного содержания обнаруженных ионов в зависимости от соотношения m/z.

1.4.3. Колебательная и флуоресцентная спектроскопия

В последние годы сочетание методов анализа колебательной (т. е. ближней инфракрасной, средней инфракрасной и комбинационной) и флуоресцентной спектроскопии с многомерными методами привело к разработке быстрых подходов для качественного и количественного анализа нескольких пищевых матриц [113]. С помощью этого аналитического метода характеристические спектры могут быть оценены с помощью хемометрических методов для получения информации о происхождении или обработке пищевых продуктов. Кроме того, неразрушающий

характер в сочетании с минимальной пробоподготовкой как вибрационной, так и флуоресцентной спектроскопии делают эти методы перспективными для быстрого, эффективного и надежного мониторинга пищевых продуктов для защиты потребителей от потенциальной фальсификации.

Несколько применений вибрационной спектроскопии были применены для оценки подлинности мяса [114], рыбы и морепродуктов [115], меда [116], вина [117] и зерновых [118]. Ранее также был проведен широкий обзор различных аналитических методов оценки качества пищевых продуктов, основанных на флуоресцентной спектроскопии [119].

Несмотря на преимущества применения вибрационной спектроскопии в качестве крупномасштабного инструмента снятия «отпечатков пальцев» для отслеживания пищевых продуктов, необходимо внедрение баз данных пищевых спектров. Кроме того, эти методологии также требуют сочетания с другими аналитическими методами для полной характеристики потенциальных изменений в пищевых компонентах на молекулярном уровне.

1.4.4. Ядерный магнитный резонанс

Ядерный магнитный резонанс (ЯМР) представляет собой методологию золотого стандарта для анализа пищевых продуктов на метаболиты, предоставляющую ценную информацию о качестве, географическом происхождении и обработке. Среди нескольких стратегий на основе ЯМР для исследования метаболического состава пищевых продуктов (т. е. целевого анализа, профилирования метаболизма, снятия «отпечатков пальцев» и метаболомики) метаболомика является наиболее всеобъемлющим подходом [120].

Схематичный рабочий процесс анализа метаболомики на основе ЯМР показан на рисунке 1. Сначала следует определить четкие критерии отбора проб, чтобы обеспечить представление целых популяций и наличие соответствующей документации об их свойствах. Подготовка образца обычно включает стадию экстракции, на которой представляющие интерес соединения извлекаются из пищевого продукта с использованием подходящих растворителей. Для достижения

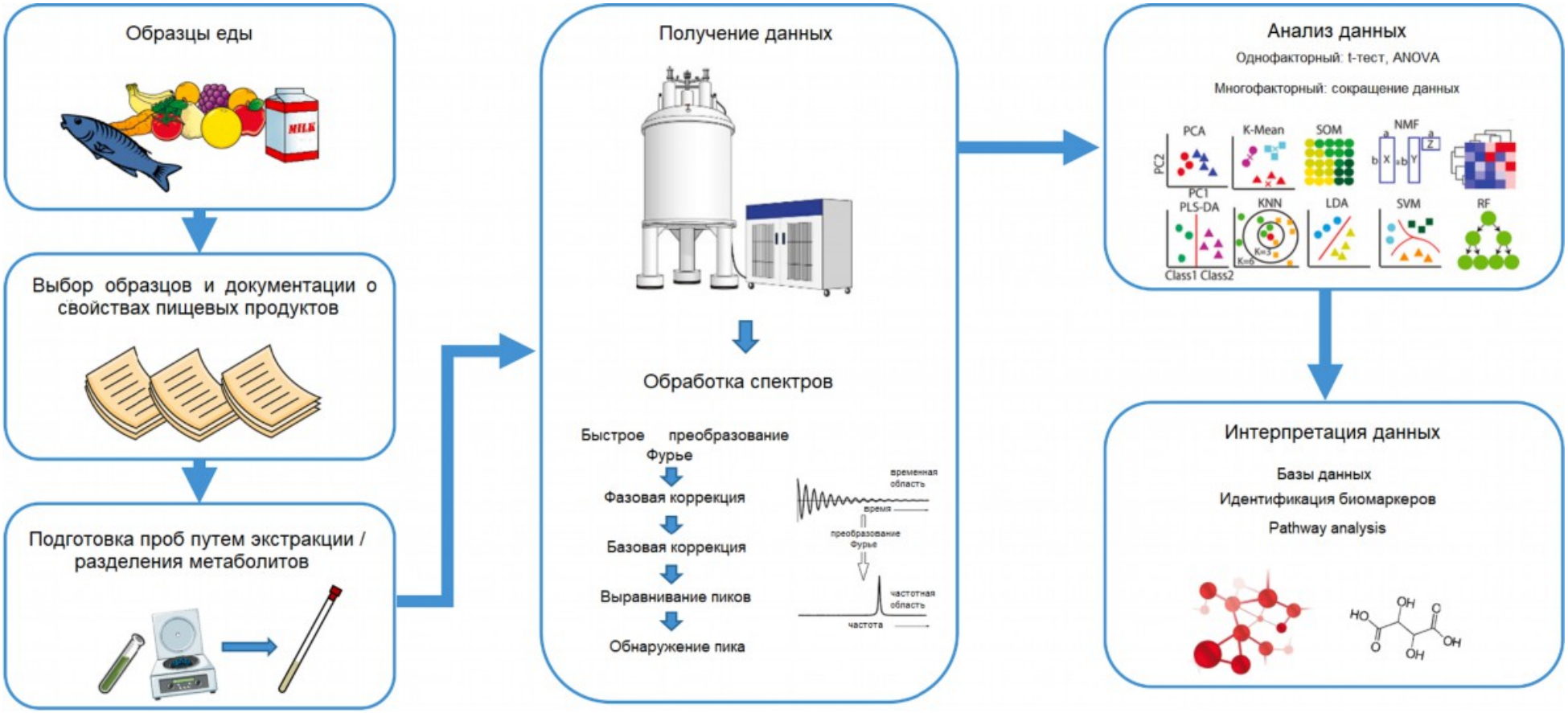


Рисунок 1 – Рабочий процесс метаболомики на основе ЯМР для анализа пищевых продуктов. Показаны важнейшие этапы, такие как сбор и подготовка проб, обработка спектров и анализ данных.

состояния раствора на ЯМР-анализа образцы ресуспендируют в соответствующих ЯМР-растворителях, которые также содержат эталонное соединение. После получения ЯМР набор доменных сигналов, называемых обрабатывается и преобразуется в спектры, которые затем используются для идентификации соединений с использованием многомерного статистического анализа соответствующих значений химического сдвига.

Учитывая химическую сложность пищевых матриц и высокий динамический диапазон метаболитов, чувствительность ЯМР является основным ограничением этого метода, особенно по сравнению с масс-спектрометрией. Тем не менее, непрерывное развитие аппаратных технологий позволяет анализировать еще более малые объемы образцов за счет использования криогенно охлаждаемых ЯМР-зондов (криозондов) со значительным повышением чувствительности.

Consonni и его коллеги недавно предложили всеобъемлющий обзор последних приложений в области композиционного анализа, аутентификации продуктов питания, контроля качества и питания человека [121].

1.4.5. Масс-спектрометрия с изотопным соотношением

Среди подходов МС, масс-спектрометрия с изотопным соотношением (IRMS) широко применяется для аутентификации и отслеживания пищевых продуктов, предоставляя ценную информацию о географическом, химическом и биологическом происхождении продуктов питания путем измерения относительных изотопных соотношений их компонентов [122, 123]. В подходах IRMS вместо специального изучения пищевых белков и пептидов обычно с высокой количественной точностью анализируются цельные пищевые продукты или отдельные ткани животных или растений.

1.5. Протеомные подходы для обнаружения биомаркеров на основе белков и пептидов для профилирования пищевых продуктов

Среди методик масс-спектрометрии и спектроскопии, используемых в настоящее время при анализе пищевых продуктов, методы, основанные на анализе

белков и пептидов с помощью MS технологий, находятся на переднем крае в качестве инструментов для оценки подлинности пищевых продуктов из-за их чувствительности, специфичности, способности к мультиплексированию и высокой пропускной способности. Дополнительные преимущества, такие как относительная стабильность белка/пептида в пищевой промышленности, также поддерживают разработку новых рабочих процессов MS на основе белка для контроля подлинности пищевых продуктов.

Для качественной идентификации видоспецифичных пептидных маркеров, полезных для идентификации пищевых продуктов, могут быть выбраны конкретные протеомные подходы, «подходящие для конкретной цели». Многие методы также доступны для количественного протеомного анализа [124]. Иногда количественное определение специфических маркеров с помощью LC-MS также может быть легко получено с помощью экстрагированных ионных хроматограмм (EIC) путем измерения высоты пиков или интегрирования областей пиков для определения содержания пептидов.

Нецелевые методы могут лучше подходить для ранних этапов рабочих процессов обнаружения пищевых биомаркеров, в то время как целевые подходы обычно предпочтительнее для более поздних этапов проверки и внедрения.

1.5.1. Нецелевой протеомный подход

Увеличение результатов исследований в области нецелевых протеомных стратегий в анализе пищевых продуктов в течение последнего десятилетия тесно связано с наличием улучшенных приборов для масс-спектрометрии с высоким разрешением (HRMS) и передового удобного программного обеспечения для обработки данных. Нецелевые подходы строго связаны с «-омиксной» концепцией характеристики всего протеома, определяемой как набор всех белков, экспрессируемых клеткой или тканью в определенный момент. Анализ, зависящий от данных (DDA), является наиболее популярным способом сбора нецелевых стратегий МС. В режиме DDA спектры фрагментации MS/MS регистрируются для фиксированного числа наиболее распространенных ионов, обнаруженных во время

обзорного MS-сканирования. Как правило, учитывая высокий динамический диапазон белков в пищевых матрицах, для нецелевого протеомного профилирования требуется этап подготовки образца для обогащения или частичной очистки определенного подмножества целевых белков или очистка от потенциальных мешающих белков [125]. Кроме того, перед анализом MS дальнейшая стадия разделения, обычно основанная на гель-электрофорезе (подход на основе геля) и/или жидкостной хроматографии (подход без геля), выполняется на уровне белка и/или пептида. Два типичных рабочих процесса, используемых в настоящее время для идентификации и характеристики белка с использованием MS, основаны на так называемых подходах «снизу-вверх» (англ. *bottom-up*) и «сверху-вниз» (англ. *top-down*). В протеомике «сверху-вниз» интактные белки или крупные фрагменты белка непосредственно подвергаются фрагментации в газовой фазе для анализа MS/MS. Напротив, в подходах «снизу-вверх», широко используемых для идентификации белка MS, сложные белковые смеси или очищенные белки подвергаются протеолитическому расщеплению, и полученные пептиды анализируются MS или MS/MS.

Принципиальная схема протеомного рабочего процесса «сверху-вниз» показана на рисунке 2A. Первая разработанная стратегия «снизу-вверх» была внедрена более 36 лет назад путем объединения двумерного электрофореза в полиакриламидном геле (2-DE) с «отпечатками пальцев» пептидных масс (PMF) с помощью MALDI-TOF. Поисковые системы, такие как Sequest и Mascot, часто используются для сопоставления и оценки присвоения пептида белку путем сравнения точных экспериментальных и теоретических масс пептидов из кураторских баз данных белков. Большинство алгоритмов также статистически анализируют данные, чтобы найти наилучшее соответствие на вероятностных основаниях. Это может быть достигнуто путем вычисления вероятности того, что наблюдаемое совпадение не является случайным событием.

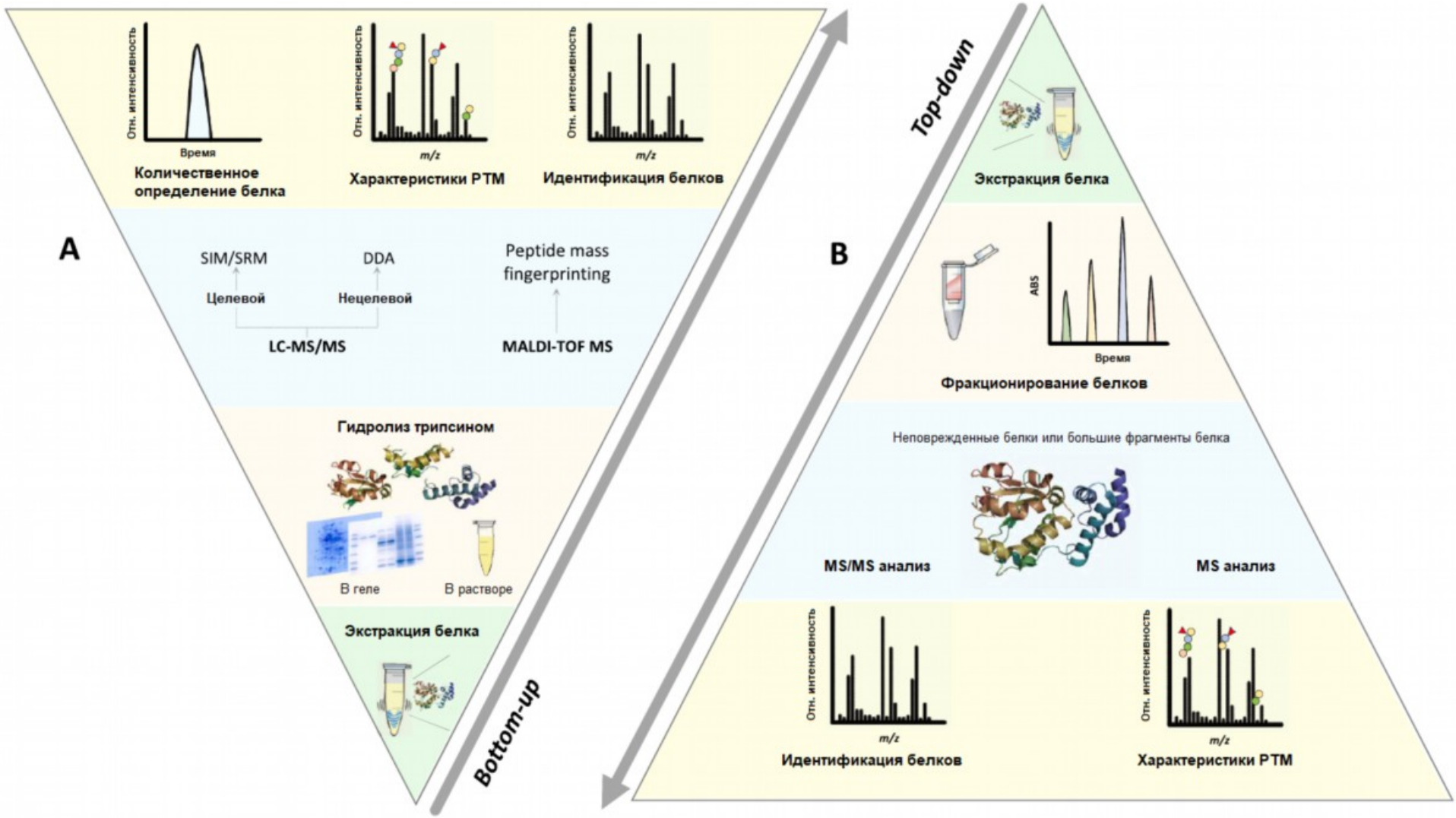


Рисунок 2 – Схематические диаграммы «снизу-вверх» (A) и «сверху-вниз» (B) подходов протеомики на основе МС, обычно используемых в исследованиях пищевых продуктов.

Несмотря на то, что стадия фракционирования, основанная на электрофорезе (моно - или двумерном), все еще используется в протоколах «снизу-вверх», идентификация белка с помощью PMF на основе MALDI-TOF в настоящее время в основном заменена методологиями LC-ESI MS/MS. В так называемых протеомных подходах «дробовика» (англ. *shot-gun*) ферментативное расщепление белка осуществляется непосредственно в растворе на сложных белковых смесях без предварительной стадии электрофоретического фракционирования. Полученные пептиды затем разделяют с помощью обращённо-фазововой ВЭЖХ или UPLC, соединенных в режиме онлайн с масс-спектрометрами для анализа MS/MS. В отличие от PMF, идентификация белка с помощью анализа MS/MS также основана на аминокислотном секвенировании пептида, полученного в результате диссоциации, вызванной столкновением (CID) или фрагментации с-ловушки с более высокой энергией (HCD).

В стратегиях «сверху-вниз» ионы из интактных белков, генерируемые обычно электрораспылительной ионизацией, подвергаются фрагментации CID, HCD и диссоциации с переносом электрона (ETD), в результате чего образуются моноизотопные молекулярные массы как интактного белка, так и его фрагментов (рисунок 2B). Этот анализ может интегрировать и поддерживать информацию, полученную с помощью таких подходов, в частности, в отношении наличия и локализации посттрансляционных модификаций (PTM). Однако сложность многозарядных изотопных кластеров из интактных белков и связанных с ними фрагментов по-прежнему ограничивает широкое использование стратегий «сверху-вниз» для высокопроизводительной идентификации интактных белков.

1.5.2. Целевой протеомный подход

Ограниченная чувствительность протеомных подходов «дробовика», связанная с высоким динамическим диапазоном сложных пищевых матриц, наряду с высоким сходством в их химическом составе, является одним из основных ограничений в анализе пищевых продуктов. Тем не менее, профилирование протеома образцов пищевых продуктов обычно является первым шагом для

идентификации подходящих пептидов при разработке целевых методов, направленных на мониторинг или количественную оценку видоспецифичных биомаркеров в пищевых матрицах.

Действительно, в отличие от нецелевых подходов, которые фокусируются на одновременном обнаружении многих неизвестных потенциальных биомаркеров, целевые протеомные анализы могут использоваться для обнаружения и количественной оценки ограниченного числа специфических пептидных ионов. Этот выборочный мониторинг особенно полезен для количественной оценки пептидов с низким содержанием, которые обычно трудно обнаружить с помощью нецелевых подходов. В режимах сбора, известных как мониторинг выбранных ионов (SIM) или мониторинг выбранных ионов MS/MS (SMIM), выбранные значения m/z ионов-предшественников обнаруживаются или фрагментируются, соответственно, в заданном диапазоне времени или в течение всего хроматографического цикла. Кроме того, мониторинг выбранной реакции (SRM) представляет собой режим тандемного сбора, в котором одновременно контролируется ион-предшественник и ион связанного продукта, в то время как при мониторинге множественной реакции (MRM) для целевого анализа может быть выбрано несколько ионов-предшественников и продуктов. Ограничивая диапазон масс захвата вокруг значения m/z интересующего иона(ов), по сравнению с EICs при полном сканировании, целевые режимы сбора значительно повышают чувствительность обнаружения, поскольку масс-спектрометру разрешается задерживаться в течение более длительного времени в небольшом диапазоне масс.

Уникальные возможности масс-спектрометров с тройным квадруполем (QqQ) чрезвычайно подходят для количественного целевого анализа. В режиме SRM первый и третий квадруполи действуют как фильтры для выбора предопределенных значений m/z ионов-предшественников и фрагментов данного пептида, в то время как второй квадруполь служит ячейкой столкновения (рисунок 3A). Можно отслеживать несколько переходов (пары ионов предшественника/фрагмента), получая набор хроматографических следов, в которых совместно элюирующие фоновые ионы отфильтровываются, повышая

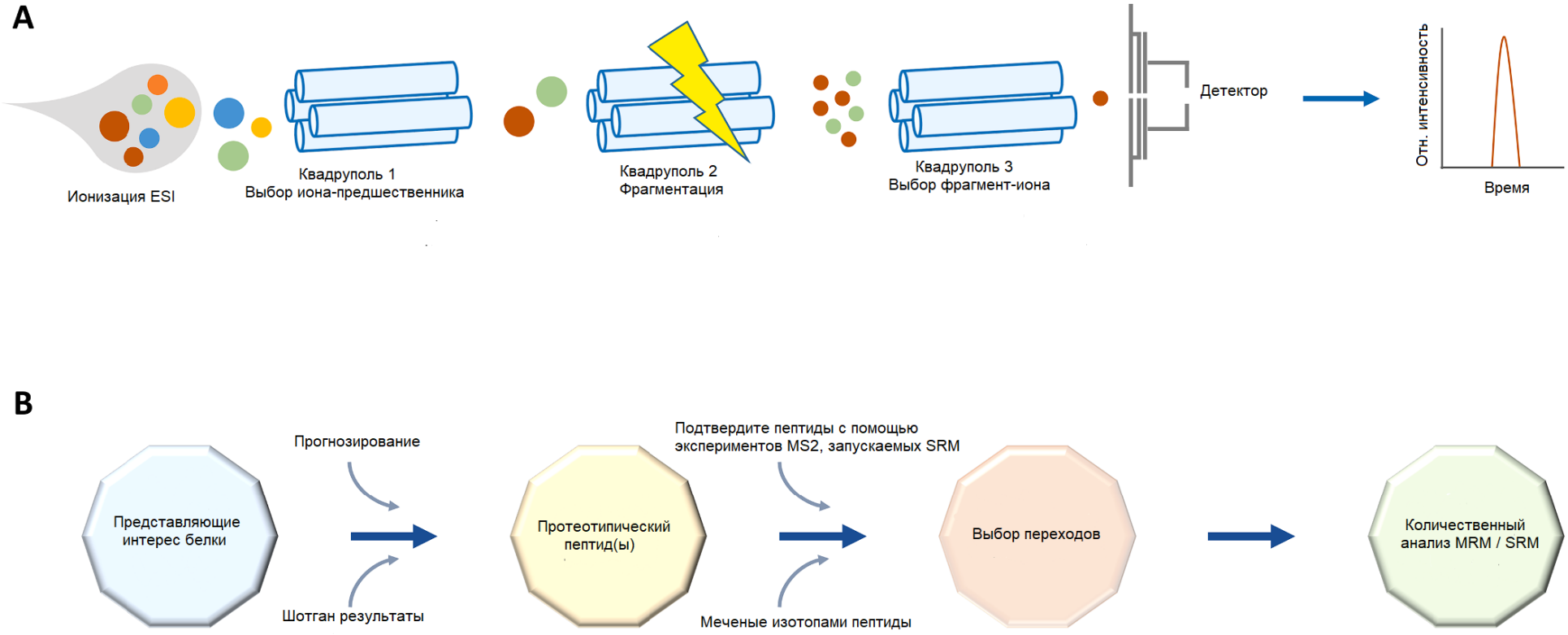


Рисунок 3 – Типичная схема режима сбора данных SRM / MRM на трехквадрупольном масс-спектрометре (A). Типичный рабочий процесс целевого количественного анализа с помощью масс-спектрометрии на основе мониторинга протеотипических пептидов (B).

чувствительность до пяти порядков с линейным откликом в широком динамическом диапазоне в очень сложных смесях, таких как пищевые продукты.

Решающим этапом целевых экспериментов является выбор и оптимизация переходов, которые впоследствии используются для целей количественного определения (рисунок 3B). Сначала, начиная с интересующего белка, набор пептидов, называемых протеотипическими пептидами, выбирается на основе их хороших ответов на МС и уникального назначения целевому белку. Затем для каждого перехода оптимизируются инструментальные параметры, такие как параметры ионизации и фрагментации. Перед количественным определением целевого белка в образцах требуются этапы проверки, включая определение пределов обнаружения (LOD) и количественное определение (LOQ).

Помимо канонических экспериментов SRM, выполняемых на тройных квадрупольных масс-спектрометрах, методы сбора, известные как «псевдо SRM», проводятся на линейных ионных ловушках или квадрупольных времяпролетных масс-спектрометрах (Q-TOF). Этот режим сканирования основан на получении при фрагментации иона-предшественника данных MS/MS в ограниченном диапазоне масс, включая интересующий ион-фрагмент. Несмотря на сходство с экспериментом SRM, его, по сути, можно рассматривать как симуляцию, сфокусированную на выбранных фрагментарных ионах [126].

В целом, целевые режимы сканирования наиболее подходят для обнаружения известных пептидов в сложных белковых смесях и уже зарекомендовали себя как эффективные инструменты для аутентификации пищевых продуктов.

1.6. Применение масс-спектрометрического анализа на основе белка для проверки подлинности пищевых продуктов (аутентификация)

Аутентификация пищевых продуктов необходима для проверки соответствия данного продукта описанию на этикетке в соответствии с конкретными требованиями к составу. Хотя конкретные правила могут отличаться в разных странах, для многих пищевых продуктов должны соблюдаться более

строгие требования, касающиеся видов происхождения или разнообразия организма. Как следствие, одним из основных вопросов подлинности является необходимость мониторинга того, были ли пищевые продукты одного вида смешаны с аналогичным материалом, полученным из вида более низкой стоимости. Масс-спектрометрический анализ на основе белка все чаще применяется для проверки подлинности пищевых продуктов [127-129].

Поэтому рассмотрены значительные литературные исследования, индексированные в базе данных Scopus и опубликованные на различных пищевых матрицах за последние десять лет, используя пептиды и белки в качестве маркеров подлинности и прослеживаемости пищевых продуктов с помощью стратегий масс-спектрометрии.

1.6.1. Мясные и белковые ингредиенты в пищевых продуктах

Потенциал масс-спектрометрического анализа интактных белков для видообразования мяса давно признан с момента первого исследования, в котором сообщалось об определении молекулярных масс гемоглобина и миоглобина у разных видов животных методом ESI-MS [130]. Впоследствии доказательства того, что оценка различий в массе белка может быть ценной стратегией для определения вида мяса, были подкреплены разработкой подходов ESI-MS/MS, основанных на использовании фрагментов белка [131]. Совсем недавно достижения в области инструментальных технологий масс-спектрометрии позволили преодолеть ограничения этих новаторских попыток (таблица 1).

Таблица 1 – Исследования, опубликованные за последние десять лет о применении масс-спектрометрических анализов на основе белков и пептидов для мяса.

Метод МС	Цель исследований	Пептид/Белковый маркер	Литературный источник
2-DE MALDI-TOF	Обнаружение КРС, свинины, мяса кур, индейки, утки и гуся	Легкие цепи миозина	Montowska и соавт., 2012; 2013 [132, 133]
	Обнаружение мяса буйволов, овец и коз	Пептиды легких цепеймиозина	Naveena соавт., 2018 [134]
LC- MS/MS (TOF)	Обнаружение мяса птицы (курица)	Пептиды легких цепей миозина	Sentandreu соавт., 2010 [34]
	Обнаружение немясных белков в говяжьих бургерах	Пептиды сои, гороха,свеклы и молока	Mikołajczak соавт., 2019 [2]
	Обнаружение аллергенных белков в колбасах, сосисках и паштете.	Пептиды сои, молока и яичного белка	Montowsa &Fornal, 2018 [28]
	Обнаружение свинины,говядины, мяса кур, утки и гусиного мяса	Пептидные маркеры из мяса	Montowska & Fornal, 2017 [14]
	Обнаружение конины,свинины и говядины	Пептиды миозина и миоглобина	Montowska & Spychaj, 2018 [4]
	Обнаружение говядины, конины, свинины и баранины	Миозин, миоглобин, пептиды гемоглобина	Orduna соавт.,2015; 2017 [1, 135]
	Обнаружение мяса кур,свинины, говядины, утки, гусиного мяса и аллергенов	Пептиды мяса, сои, молока и яичного белка	Montowska & Fornal, 2019 [26]
	Обнаружение аллергенных белков в колбасах	Ячмень, кукуруза, овес, рис, пептиды ржи	Jira & Munch,2019 [11]
	Обнаружение аллергенных белков в колбасах	Люпин, гороховые и соевые пептиды	Hoffmann соавт., 2017 [31]

Метод МС	Цель исследований	Пептид/Белковый маркер	Литературный источник
LC- MS/MS (MRM)	Обнаружение сои, молока и яичного белка в мясных продуктах	Пептиды из мяса, сои, молока и яиц	Montowska соавт., 2019 [136]
	Обнаружение видов мяса в соусе Болоньезе	Пептидные маркеры из мясных белков	Prandi соавт., 2019 [18]
	Обнаружение конины исвинины в халяльной говядине	Пептидные маркеры из мясных белков	Von Bargen соавт., 2013; 2014 [21, 137]
	Обнаружение свинины в говядине, шевроне и курином мясе	Пептидные маркеры из мясных белков	Sarah соавт., 2016 [6]
	Обнаружение говядины, свинины, конины и баранины	Пептиды миоглобина	Watson соавт., 2015 [138]
	Обнаружение свинины,говядины, баранины, мяса кур, утиного мяса и аллергенов	Соевые, арахисовые, гороховые и мясные пептиды	Li соавт., 2018 [12]
	Обнаружение свинины,мяса кур, утки, говядины, баранины	Пептидные маркеры из мясных белков	Wang соавт., 2018 [20]
	Обнаружение утки, гуся, мяса кур, свинины и говядины	Пептидные маркеры из мясных белков	Fornal & Montowska,2019 [8]
	Проверка подлинностисырых свиных отрубови продуктов переработки	Пептиды миоглобина	Nalazek- Rudnicka соавт.,2019 [35]

Комбинированный подход, использующий 2-DE и MALDI-TOF MS, использовался для выявления различий в структуре белка между мясом крупного рогатого скота, свиней, курицы, индейки, утки и гуся и продуктами их переработки. В этой работе изоформы легкой цепи миозина вместе с некоторыми регуляторными

белками и метаболическими ферментами были идентифицированы в качестве белковых маркеров для идентификации мяса [132, 133]. Основываясь на этих выводах, Naveena и соавт. также использовали как двумерный, так и гелевый электрофорез в сочетании с MALDI-TOF MS для идентификации сырого и приготовленного мяса буйволов, овец и коз и их смесей путем мониторинга видоспецифичных пептидных маркеров, полученных из легких цепей миозина [134].

Была разработана протеомная методика для обнаружения куриного мяса в модельных мясных миксах с использованием изоэлектрической фокусировки в геле, связанной с LC-ESI MS/MS [34]. Начиная с выбранных видоспецифичных биомаркеров, в том же исследовании сообщалось о разработке количественного подхода, позволяющего обнаруживать до 0,5% (мас. %) загрязняющих куриное мясо в мясе свинины с использованием стабильных изотопов пептидов для абсолютного количественного определения (AQUA™) [34].

Также было показано, что масс-спектрометрия с высоким разрешением подходит для выявления растительных белков с аллергенным потенциалом в различных типах мясных продуктов. В частности, анализ nano-LC-ESI-Q-TOF MS/MS на сосиски, колбасы и паштеты позволил идентифицировать аллергенные белки из сои, молока и яичного белка [28]. Поскольку яйца широко используются в пищевой промышленности, недавно также был опубликован список из 16 потенциальных пептидных биомаркеров для обнаружения яиц в других обработанных пищевых продуктах [9]. Hoffmann и соавт. контролировали специфические маркерные пептиды для одновременного обнаружения люпина, гороха и сои в сосисках [31]. После оптимизации целевой методологии MRM авторы продемонстрировали возможность одновременного обнаружения белков люпина, гороха и сои в бобовых продуктах с LOD в диапазоне 2-5 мг/кг [31]. Jira и соавт. аналогичным образом исследовали присутствие шести наиболее важных видов зерна (т. е. ячмень, кукуруза, овес, рис, рожь и пшеница) в сосисках с пределом обнаружения ниже 5 мг/кг [11]. Кроме того, LC-ESI-Q-TOF MS/MS был применен для анализа готовых к приготовлению гамбургеров промышленного

производства с целью выявления белков сои, гороха, молока и свеклы, включая известные аллергенные белки из сои (глицинин и β-конглицинин), гороха (вицилин и провицилин) и молока (aS1-казеин и β-лактоглобулин) [2]. LC-ESI-Orbitrap MS/MS с высоким разрешением также оказался эффективным для обнаружения мяса говядины, лошади, свинины и баранины в мясных смесях путем мониторинга протеотипических пептидов из миозина, миоглобина и гемоглобина [1, 135].

В контексте количественных методов на основе MS с высоким разрешением, подходы без меток также представляют собой надежную, универсальную и более дешевую альтернативную методику MS для аутентификации мяса. В частности, nano-LC-ESI-Q-TOF MS/MS позволил различать мясо свинины, говядины, курицы, утки и гуся, а также количественно определять относительные изменения содержания белка в различных коммерчески обработанных мясных продуктах с использованием 20 термостабильных пептидных маркеров [14]. Метод позволил обнаружить 1% (мас. %) курицы и 1% (мас. %) свинины в мясных смесях трех видов, а также 0,8% (мас. %) говяжьих белков в коммерческих сосисках из птицы. Аналогичный подход был предложен для аутентификации промышленно обработанных колбас, изготовленных из конины, свинины и говядины, с содержанием LOD 5% (мас. %) свинины и говядины и 1% (мас. %) конины в матрице, содержащей три компонента [4]. Те же авторы также сообщили о применении стратегии AQUA [26] и анализа LC-ESI-QqQ в режиме MRM [136] для одновременной количественной оценки мяса и аллергенных белковых добавок в мясных продуктах с использованием пептидных маркеров, идентифицированных в предыдущих исследованиях [8, 14, 28]. Действительно, с помощью анализа MRM в конечных мясных продуктах был достигнут LOD 0,14% (мас. %) для молочных белков и 0,45% (мас. %) для белков сои и яичного белка [136].

Von Bargen и соавт. разработали метод MRM для обнаружения конины и свинины в халяльной сырой говядине с использованием видоспецифичных пептидов триптических маркеров с LOD 0,55% (мас. %). Используя режим MRM, авторы смогли повысить чувствительность и обнаружить загрязнение свинины говядиной до 0,13% (мас. %) [137]. Аналогичный экспериментальный протокол

позволил проанализировать обработанные/сильно обработанные образцы пищевых продуктов с содержанием LOD до 0,24% (мас. %) для мяса лошади или свинины в матрице говядины [21].

Для быстрого и надежного обнаружения видов мяса в пищевых продуктах были разработаны другие количественные подходы MRM. Среди них пептиды миоглобина были успешно использованы в качестве белковых маркеров для количественного определения видов мяса (т. е. говядины, свинины, конины и баранины) [138] и аутентификации коммерчески сырых свиных отрубов и других мясных продуктов [35]. MRM также использовался для идентификации на качественном уровне пептидных маркеров, специфичных для свиней, в термически обработанном мясе, чтобы отличать свинину от говядины, козлятины и куриного мяса [6]. Кроме того, термостабильные специфические пептиды использовались для идентификации и одновременной количественной оценки восьми различных видов (т. е. свинины, говядины, баранины, мяса кур, утки, сои, арахиса и гороха), что позволило обнаруживать до 0,5% (мас. %) загрязнения любого из восьми видов в пищевых смесях собственного производства [12]. Другие термостабильные пептидные биомаркеры также использовались для обнаружения на основе MRM пяти видов животных (т. е. свинины, мяса кур, утки, говядины и овец) в копченом мясе [20]. В цельных готовых продуктах протеотипические пептиды из восьми различных видов мяса (т. е. утки, кролика, курицы, индейки, буйвола, лошади, оленя и овцы) были идентифицированы в соусе Болоньезе с содержанием LOD от 0,2% до 0,8% (мас. %) [18].

Что касается ингредиентов животного происхождения, то желатин является одним из наиболее широко используемых в пищевой промышленности в качестве стабилизатора пены, желирующего, осветляющего или связующего агента и эмульгатора. Желатин получают путем частичной денатурации коллагена, извлеченного из кожи, костей и соединительных тканей животных, таких как крупный рогатый скот (КРС) и свиньи. Точный и чувствительный подход nano-LC-ESI Q-TOF MS/MS был разработан для определения происхождения видов в коммерческих пищевых желатинах, мясных смесях и экстрактах, приготовленных

из мяса [139]. Yang и его коллеги также разработали целевую стратегию видообразования желатина [140]. В этой работе видоспецифичные пептидные биомаркеры были идентифицированы, охарактеризованы и количественно определены с использованием экстрагированных ионных хроматограмм методом анализа LC-ESI-Orbitrap MS/MS. Затем метод был протестирован на желатине, используемом в мясной нарезке, полученной из продуктовых магазинов, фруктовых закусках и желатиновых капсулах, что позволило обнаружить до 0,1% (мас. %) свиного желатина [140]. Кроме того, один пептид-маркер свиньи из желатина был выбран для разработки чувствительного подхода на основе MRM для идентификации свиных материалов как в домашних, так и в коммерческих продуктах до 0,04% (мас. %) [141]. Yilmaz и его коллеги разработали рабочий процесс nano-UPLC-ESI-Q-TOF MS^E (т. е. MS с повышенной энергией) на основе пептидов-маркеров для идентификации животного происхождения желатина из свиней и КРС в молочных продуктах, таких как йогурт, сыр и мороженое [142]. Метод сбора данных MS^E с тандемной MS основан на чередовании диссоциации, вызванной столкновением с низкой энергией, и диссоциации, вызванной столкновением с высокой энергией, где первая используется для получения точных данных о массе и интенсивности ионов-предшественников для количественной оценки, а последняя используется для получения точной массы ионов продукта.

1.7. Заключение к литературному обзору

Значимым проблемным вопросом отечественной мясоперерабатывающей промышленности считается качество поступившего мясного сырья на предприятия. В большой мере это связано с повсеместным использованием импортного мяса в блоках, которое отличается нестабильными и часто низкими функционально-технологическими свойствами. Всё это сказывается на качестве в итоге конечного продукта, его свойствах и органолептических признаках. Изменением качества сырья достигаются требуемые характеристики производимых продуктов. А использование низкосортного сырья дает возможность уменьшить первоначальную себестоимость конечного продукта,

увеличить его выход, повысить конкурентоспособность в непростых условиях современного рынка. Оценить все изменения в рецептурах в настоящее время в лабораторном контроле до сих пор весьма проблематично.

Не теряет своей актуальности не только совершенствование имеющейся методической базы, но и адаптация фундаментальных аспектов при разработке высокопроизводительных и точных методов, позволяющих идентифицировать и выявлять монокомпоненты в продуктах с мультисоставом. На протяжении последних лет в области масс-спектрометрии и протеомики мяса наблюдается повышение интереса не только научных коллег, но и контролирующих организаций. Были разработаны различные стратегии и направления, идущие на сквозную идентификацию. Много исследований направлено на изучение влияния технологических процессов, биохимические свойства мышечных белков, определения различных биомаркеров того или иного состояния мышечной ткани.

Приведенный обзор научной литературы формирует заключение о том, что растущее практическое использование методологий масс-спектрометрии (МС) для аутентификации и идентификации пищевых продуктов обусловлено их непревзойденной специфичностью, точностью и чувствительностью. Такие функции имеют решающее значение для разработки аналитических стратегий для обнаружения фальсификации пищевых продуктов и фальсификации путем мониторинга отдельных компонентов в пищевых матрицах. Поскольку аутентификация пищевых продуктов, качество и безопасность пищевых продуктов привлекают внимание общественности, в последние годы возрастает необходимость в разработке и применении более эффективных инструментов и методологий для анализа пищевых компонентов. В этой связи также желательно создать инновационные технологические платформы для отслеживания подлинности пищевых продуктов и проверки соответствия продукции описаниям на этикетках.

ГЛАВА 2. ОРГАНИЗАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Организация работы

Разработка методики исследования протеотипических пептидов для количественного анализа мышечных белков в мясной продукции требует навыков работы с аналитическими методами хроматографии, масс-спектрометрии, анализа белка и статистического расчета. Экспериментальные исследования проведены в лаборатории «Научно-методические работы, биологические и аналитические исследования» ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН.

Согласно анализу отечественных и зарубежных источников литературы, относительно подходов к изучению и методов анализа белков и пептидов, была определена схема исследования (рисунок 4), включающая поиск, хроматографическое разделение маркерных пептидов, определение количества белок и апробацию для методики полуколичественного определения мультивидов. Были определены методы анализа белков (спектрофотометрические, хроматографические). Рассмотрены основные подходы протеомики в области идентификации и измерения видоспецифических пептидов и белков. Рассмотрены аналитические инструменты распознавание видоспецифических белков с помощью ДНК-гибридизации и ПЦР анализа, иммуноанализов (ELISA) и ВЭЖХ-МС, применяемой для обнаружения анализа протеотипических пептидов.

На первом этапе исследований были сформулированы цель и задачи. Показана актуальность и необходимость использования баз данных в разработке методик идентификация протеотипических пептидов маркерных белков при помощи MRM метода. На втором этапе были осуществлены задачи поиск наиболее подходящих протеотипических пептидов для определения мышечной ткани основного сырья (свинина, говядина, мясо кур) в модельных образцах с заданным содержанием основных компонентов смеси. На третьем этапе работы была проведена апробация и построены градуировочные графики 7-ми протеотипических пептидов для аутентификации мышечной ткани свинины и

говядины, также были синтезированы и охарактеризованы 2 маркерных пептида для дальнейших исследований при разработке полуколичественной методики (Приложение А).

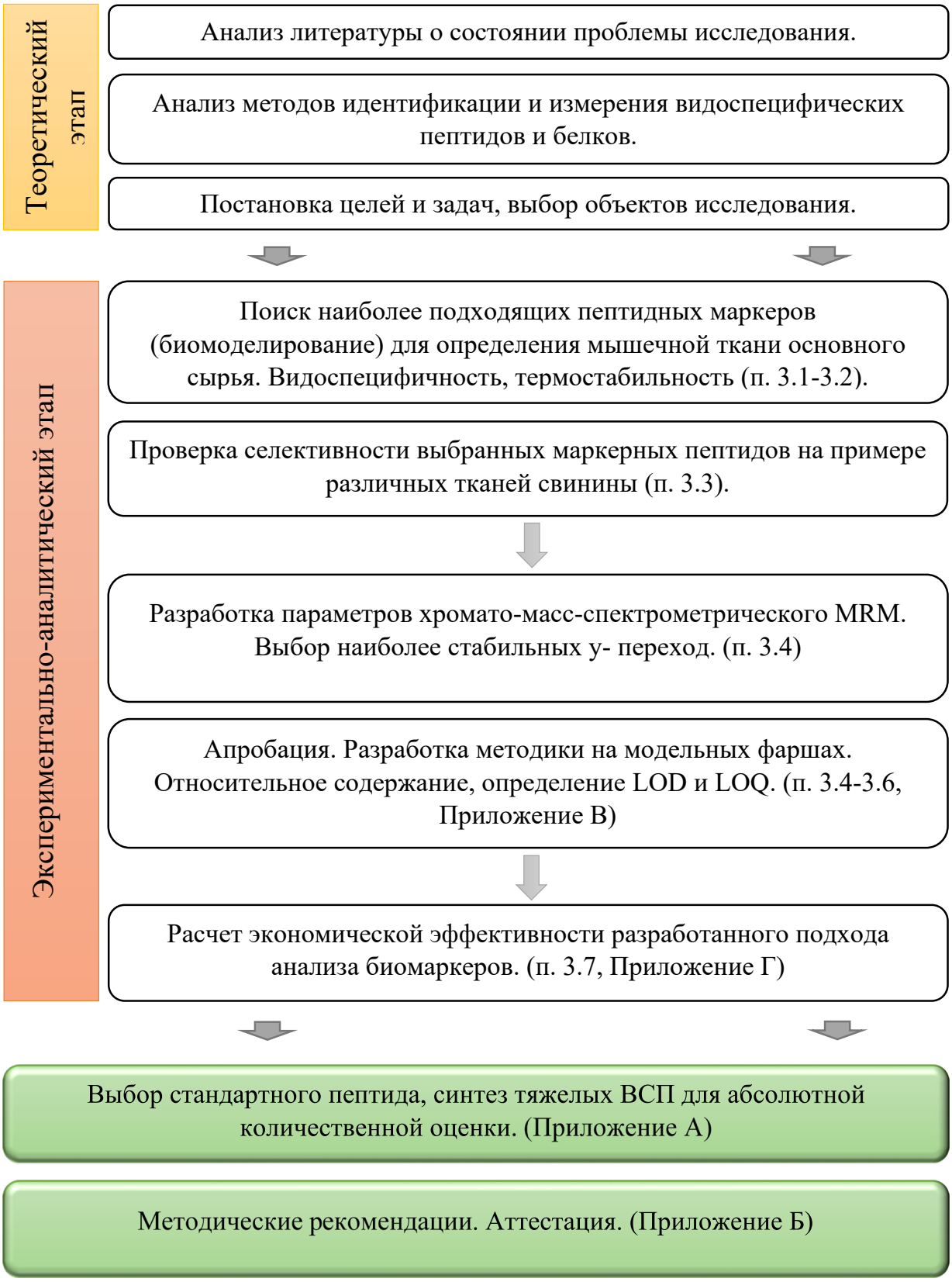


Рисунок 4 – Схема проведения исследований.

По результатам работы было разработано приложение для аттестованной методики № 241.0067/RA.RU.311866/2021 «Методика измерений массовой доли мясного ингредиента кур в пробах мясной продукции, выработанной по национальным и межгосударственным стандартам (за исключением консервов), методом флуоресценции для детектирования продуктов полимеразной цепной реакции в реальном времени» (утв. в 2021 г., на 25 стр.) (Приложение Б).

2.2. Объекты исследований

В качестве объектов исследований для определения протеотипических пептидов говядины и свинины служили модельные рецептуры, выработанные по технологии вареных колбас с заданным содержанием мышечной ткани по закладке. Основное мясное сырье для модельных рецептур состояло из говядины в/с (97 мас. % мышечной ткани), свинина п/ж (50 мас. % мышечной ткани), свинина жирная (20 мас. % мышечной ткани), и немясные ингредиенты, соответствующие основному колбасному фаршу по ГОСТ 23670-2019 (таблица 2). Содержание мышечной ткани по говядине и свинине было определено на модельных смесях, содержащих два уровня внесения: 8% (мас. %), 16% (мас. %) и 50% (мас. %) и 8% (мас. %) соответственно. Также были проанализированы модельные рецептуры без термической обработки и с использованием варки (режимы согласно ТИ к ГОСТ 33673-2015 Изделия колбасные вареные. Общие технические условия).

Таблица 2 – Показатель содержания мышечной ткани в рецептурах для экспериментальных смесей.

Наименование рецептуры	Свинина не жирная (90 % мас. мышечной ткани), мас. %	Свинина полу жирная (50 % мас. мышечной ткани), жирная (20 % мас. мышечной ткани), мас. %	Молоко сухое и меланж, мас. % (варьируемый)	Говядина высший сорт (97 % мас. мышечной ткани), мас. %	Соединительная ткань, жировая ткань, пищевые добавки, мас. %
1я рецептура	55,6	0,0	4,1	15,5	24,8
2я рецептура	0,0	22,3	0,0	7,7	70,0
3я рецептура	0,0	32,1	10,0	0,0	42,1

Для определения протеотипических пептидов для мышечной ткани курицы использовались сырые грудные мышцы (*m. Pectoralis major*). Для идентификации маркерных последовательностей для сухого молока и меланжа использовались модельные рецептуры, описанные выше с применением немясных ингредиентов по ГОСТ 23670-2019.

Для целей определения специфичности и селективности выявленных протеотипических пептидов в качестве объектов применяли стандартные эталонные матрицы бесструктурных фаршей из поперечнополосатых мышц свинины (*m. L. dorsi*) и говядины (*m. L. dorsi*), гладкая мускулатура аорт свиных, свиная и говяжья мышечная ткань сердечного типа, мясные консервы «Здоровое сердце», содержащие ткани миокарда (сердце) и аорты свиньи, разработанные в ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, консервы мясные «Сердце свиное в собственном соку», выработанные по ГОСТ Р 55477-2013, изготовленные в ЗАО «Йошкар-олинский мясокомбинат».

В рамках поставленной задачи по построению спектров выявленных пептидов для нативного мясного сырья и готовых мясных продуктов при помощи биоинформационной обработки данных, необходима более детальная идентификация биомаркерных белков, в связи с чем было принято решение о дополнительной полуколичественной идентификации при помощи высокотехнологических средств измерений и в разработке высокодостоверного подтверждающего метода исследований пептидома.

Для апробирован методики ЖХ-МС, адаптированной для обнаружения и количественного определения двух различных видов мяса (говядина и свинина) в сложной биологической матрице, такой как бесструктурные фарши использовались модельные образцы смеси мышечной ткани двух видов животных (образцов *m.l.Dorsi* свинины и говядины). Для построения градуировочных характеристик использовались контаминированные лабораторные образцы фаршей в следующем соотношении говядины и свинины 3:1, 1:1, 1:3, 1:20 соответственно.

2.3. Реагенты и растворители

Деионизированную воду получали с помощью системы очистки воды Milli-Q Merck (Millipore). Трис (гидроксиметил) -аминометан (99%), соляная кислота (≥37%), муравьиная кислота (≥95%), DL-дитиотреитол (≥98%), йодацетамид (кристаллический) и трипсин из поджелудочной железы свиньи (1000-2000 единиц БАЭЭ / мг твердого вещества) был приобретен Sigma Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США). Ацетонитрил (≥99,9%) был приобретен компанией Sigma Aldrich (США). Бикарбонат аммония (≥99%) был приобретен компанией Sigma Aldrich (США).

Денатурирующий раствор: 0,25% натриевой соли дезоксихолиевой кислоты, 100 мМ Tris-HCl, pH 8,5 (приготовить из 10% раствора натриевой соли дезоксихолиевой кислоты и 5-ти кратного 500 мМ Tris-HCl, pH 8,5).

Алкилирующий агент: 250 мМ йодацетамид (IAA) (приготовить из навески)

Восстанавливающие агенты: 250мМ ДТТ (1,4-дитиотреитол) (приготовить из стокового раствора 2М ДТТ)

Буферная среда для ферментативного расщепления трипсином: 50 мм триэтиламмония бикарбонат (приготовить из 1М стокового раствора)

Ингибирующий раствор: 95% муравьиная кислота (водный раствор)

Ферменты: трипсин лиофилизированный, модифицированный, полученный из поджелудочной железы свиньи Sus scrofa, специфичная активность фермента 15600 Ед/мг. Стоковый раствор для хранения 200 нг/мкл, аликвоты по 5 мкл, хранение при -20 ℃.

2.4. Методы исследований

В работе применялись химические, физико-химические, спектрофотометрические, хроматографические и масс-спектрометрические методы анализа. Для целей статистической обработки использовался двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) в программе STATISTICA 10.0 Извлечение и обработка данных производилась в Microsoft Excel 2019 (США).

Экстракция белка

На аналитических весах отбирали каждый образец массой 50 мг. Добавляли к навеске 500 мкл денатурирующего буфера (дезоксихолат натрия 10%, 25 мМ бикарбонат аммония) и перетирали в ступке до полного растворения. Образцы гомогенизированной мышечной ткани центрифугировали при максимальной скорости в течение 15 минут при 4 ℃, отбирали 10 мкл пробы в 1,5 мл пробирки (для последующего гидролиза). Остатки супернатанта хранили при -20 ℃.

Восстановление дисульфидов

Аликвоту раствора, содержащего определенное количество белка (~100 мкг) растворить в 10 мкл денатурирующего буфера. Если белок – сухое в-во, путем взвешивания определяется количество белка, с последующим растворением навески в таком объеме денатурирующего буфера, чтобы концентрация оказалась 10 мкг/мкл. Если белок уже находится в растворе (плазма крови, белковый экстракт клеток и т.д.), то сначала необходимо определить концентрацию с BCA, затем отобрать аликвоту, содержащую определенное количество белка (~100 мкг), почти полностью выпарить жидкость на центрифужном концентраторе (SpeedVac), и добавить объем денатурирующего буфера, так чтобы концентрация оказалась 10мкг/мкл. Затем к белку, растворенному в денатурирующем буфере, добавить восстановитель DTT до конечной концентрации 10 мМ. Добавить 2 мкл 250 мМ раствора DTT к 10 мкл раствора белка в денатурирующем буфере. Смесь тщательно перемешивать и инкубировать при температуре 56 ℃ в течение 60 минут в термомиксере Thermomixer Comfort (Eppendorf) [34].

Алкилирование восстановленных дисульфидов

По окончании процедуры восстановления дисульфидов к каждой пробе добавить 5 мкл алкилирующего раствора, содержащий йодацетамид, до конечной концентрации 50 мМ и тщательно перемешать. К реакционной смеси объемом 10 мкл, добавляется 5 мкл 250 мМ раствора йодацетамида. Реакционную смесь инкубировать в течение 30 минут при комнатной температуре в недоступном для дневного света месте [8, 14, 26, 34, 146].

Полный цикл ферментативного гидролиза

Дисульфидные мостики восстанавливали, добавляя 2 мкл дитиотреитола (0,1 М в воде) и инкубируя образцы при 80 ℃ в течение 20 минут. Затем сульфгидрильные группы алкилировали, добавляя 3 мкл йодацетамида (0,25 М в воде) и инкубировали в темноте в течение 1 часа при комнатной температуре. Избыток йодацетамида нейтрализовали путем добавления 20 мкл дитиотреитола (0,2 М в воде) и проводили инкубацию при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем содержание белка измеряли с помощью набора для анализа белка Quant-it (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием флуориметра Qubit (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя. Расщепление трипсином осуществляли с использованием соотношения фермента к субстрату 1:50 и инкубировали в течение ночи при 37 ℃. Ферментный гидролиз останавливали добавлением 50 мкл муравьиной кислоты (10 % по объему в воде). Образцы хранили при -20 ℃ до анализа ВЭЖХ / ESI-MC / MC. Непосредственно перед инъекцией образцы центрифугировали при 15,093 *g* в течение 10 минут при 4 ℃ и надосадочную жидкость сохраняли для анализа (рисунок 5) [14, 34, 145-147].

ВЭЖХ / ESI-MC / MC анализ

Пептиды, полученные ферментативным расщеплением, анализировали с использованием обращённо-фазовой ВЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией с ионизацией распылением в электрическом поле (ESI-MC / MC) (рисунок 5).

Для хроматографического анализа использовали колонку ZORBAX Eclipse Plus C18 с быстрым разрешением HD 2,7 мкм (50 × 2,1 мм; Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). Хроматографическое разделение проводили в Agilent 1260 Infinity ВЭЖХ (США). Скорость потока была установлена на уровне 0,4 мл / мин, температура колонки - 30 ℃, а температура образцов - 19 ℃; элюент А представлял собой воду с 0,1% (об. / об.) муравьиной кислоты, элюент В представлял собой ацетонитрил с 0,1% (об. / об.) муравьиной кислоты. Градиентное элюирование выполняли по следующим параметрам: 0–1 мин 95% А, 1–10 мин от 95% А до 40% А, 10–15 мин от 40% А до 0 % А, 15–20 мин 0% А, 20–21 мин от 0%

А до 95% А, 21–25 мин 95% А (общее время анализа 25 мин). Объем вкола в хроматограф составлял 10 мкл для всех типов образцов образцов [145-147].

Детекция осуществлялась с помощью трехквадрупольного масс-спектрометра (QQQ 6410, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) со следующими параметрами: детектирование 0–25 мин, режим положительной ионизации; напряжение на капилляре 4000 В, температура газа 250 °С; давление газа на небулайзере 25 psi (206,85 кПа); температура капилляра 250 °С.

Рисунок 5 – Схема подготовки проб.

Маркерная идентификация пептидов

Анализ белков проводили с помощью биомоделирования. При необходимости обработки полных сиквенсов белков при анализе на LC-MS / MS, возможно использование такого программного обеспечения как Spectrum Mill (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) [6, 8, 14, 26], Protein Lynx Global Server (Waters) [16, 134], Peaks Studio software (Bioinformatics Solutions, Waterloo, ON, Canada) [18] and MASCOT (Matrix Science, Boston, MA, USA) [1, 8, 14, 16, 26, 34, 135]. В данной работе использовали программу Skyline (*https://skyline.ms*),

способную проводить теоретическое расщепление белков и выводить список SRM для каждого пептида [143]. Это лучший выбор при наличие ранее изученной последовательности пептида.

Для сравнения потенциальных биомаркеров были отобраны пептиды, представленные в недавних работах [8, 14, 26, 34] (таблица 3). Были проанализированы пептиды, излучающиеся нами ранее [145, 146]. Одним из критериев специфичности маркеров является наличие последовательности больше 6 аминокислот [138]. Такая длина пептида обеспечивает видоспецифичность мышечного белка. Критерием сравнения представленных пептидов было принято решение использовать показатель сигнал/шум (S/N), применяемый для оценки качества детектирования (рисунок 6).

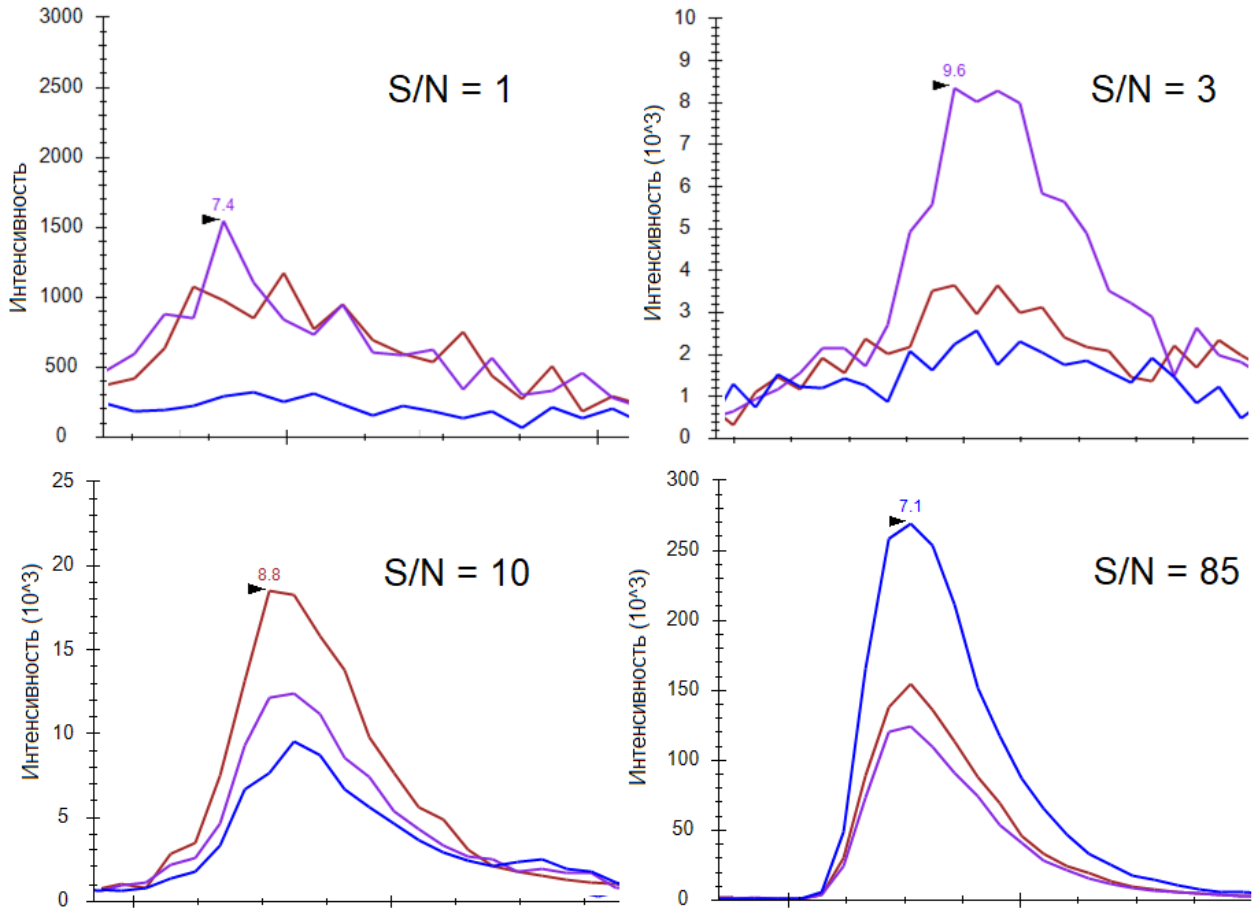


Рисунок 6 – Хроматографическое разрешение по протеотипическим пептидам в зависимости от показателя сигнал/шум.

Для метода MRM отслеживаемые переходы представлены в таблице 3. Первый дочерний ион был использован в качестве полуколичественного показателя, второй и третий - в качестве подтверждающих.

Таблица 3 – Идентификационные характеристики термостабильных протеотипических пептидов из говядины, свинины, мяса птицы (курица), сухого молока и меланжа методом ВЭЖХ-МС.

Название белка	Последовательность маркерного пептида	Материнский ион (*m/z*), дочернии ионы (*m/z*)	Энергия диссоциации (CE), В
Говядина			
Myoglobin	HPSDFGADAQAAMSK	766,8 → 1395,6, 949,4, 892,4, 821,4 511,6 → 641,3, 635,3, 507,3	24,8 13,6
	NDMAAQYK	470,7 → 580,3, 509,3	15,6
	YLEFISDAIIHVLHAK	623,7 → 797,0, 732,4, 602,4	17,7
Myosin-1	TLALLFSGPASGEAEGGPK	901,5 → 1290,6, 1143,5, 1056,5, 999,5 831,4	28,9
Myosin-2	MEIDDLASNVETISK	832,9 → 1061,6, 948,5, 877,5	26,8
	TLAFLFSGTPTGDSEASGGTK	1022,5 → 1264,6, 1207,5, 1106,5	32,7
Myosin light chain 2f	EASGPINFTVFLNMFGEK	1001,0 → 1446,7, 1185,6, 985,5, 838,4	32,0
Stress-induced-phosphoprotein	ALDLDSNC[+57.0]K	518,2 → 851,4, 736,3, 623,2	17,1
β-Hemoglobin	LHVDPENFK	549,8 → 848,4, 749,3, 634,3	18,0
Carbonic anhydrase 3	LVNELTEFAK	582,3 → 837,4, 708,4, 595,3	19,1
	GEFQLLLDALDK	681,4 → 1028,6, 900,5, 787,5	22,1
L-Lactate dehydrogenase A chain	DLADEVALVDVMEDK	831,4 → 1019,5, 948,5, 835,4	26,8
Triosephosphate isomerase	SNVSDAVAQSAR	602,8 → 904,5, 817,4, 702,4, 532,3	19,7
Свинина			
Myosin-1	TLAFLFTGAAGADAEAGGGK	913,0 → 1132,5, 1031,5, 974,5	29,3
	SALAHAVQSSR (Myosin-4)	563,8 → 784,4, 647,3, 576,3	18,5

Название белка	Последовательность маркерного пептида	Материнский ион (*m/z*), дочернии ионы (*m/z*)	Энергия диссоциации (CE), В
Myosin-2	TLAFLFSGAQTGEAEAGGTK	978,5 → 1176,5, 1119,5, 1048,5	31,3
	TLAFLFAER	534,3 → 966,5, 853,5, 782,4, 635,4	17,6
Myosin-4	HKYEETQAELEASQK	895,9 → 1233,6, 1104,6, 1003,5	28,8
	KLETDISQIQGEMEDIVQEAR	1216,6 → 1404,6, 1276,6, 1219,6 811,4 → 1090,5, 715,4	38,7 24,4
Myosin-7	LLSNLFANYAGADTPVEK	962,0 → 1235,6, 1164,6, 887,4, 472,3	30,8
Serum albumin	EVTEFAK	412,2 → 694,4, 595,3, 494,3	13,8
	FVIER	332,2 → 516,3, 417,2	11,3
	TVLGNFAAFVQK	647,9 → 924,5, 810,5, 663,4	21,1
Lactate dehydrogenase	LVVITAGAR	450,3 → 687,4, 588,3, 475,3	15,0
Myoglobin	GHPETLEK	455,7 → 716,4, 619,3, 490,3	15,1
	GHHEAELTPLAQSHATK	914,0 → 1166,7, 1053,6, 952,5	29,3
	HPGDFGADAQGAMSK	496,9 → 807,4, 621,3, 493,2, 611,3	13,1
	YLEFISEAIIQVLQSK	627,7 → 815,5, 702,4, 574,4, 475,3	17,8
β-Hemoglobin	VNVDEVGGEALGR	657,8 → 887,5, 758,4, 659,3	21,4
	FFESFGDLSNADAVMGNPK	1023,5 → 1331,6, 1216,6, 1103,5	32,7
β- Enolase	NYPVVSIEDPFDQDDWK	1034,0 → 1494,6, 1050,5, 895,4	33,1
Trifunctional enzyme subunit α	FAGGNLDVLK	517,3 → 886,5, 815,5, 758,4, 701,4, 474,3	17,0
	TVLGAPEVLLGILPGAGGTQR	673,7 → 969,5, 856,5, 743,4	19,5
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	WGDAGATYVVESTGVFTTMEK	1125,0 → 1229,6, 1100,5, 756,4	35,9
Мясо птицы (курица)			
Myosin light chain 1	MTEEEVEELMK	684,3 → 1006,5, 877,4, 748,4	22,2
	DQGTFEDFVEGLR	756,9 →1111,5, 964,5, 835,4	24,5

Название белка	Последовательность маркерного пептида	Материнский ион (*m/z*), дочернии ионы (*m/z*)	Энергия диссоциации (CE), В
Myosin light chain 3	ALGQNPTNAEINK	685,4 → 886,5, 789,4, 688,4	22,2
	TSDVDSVFFIR	643,3 → 1097,6, 883,5, 582,3	20,9
	LDVPISGEPAPTVTWK	855,5 → 1085,6, 1028,5, 899,5, 731,4	27,5
Myosin-binding protein C	IGAGGVDGYLVEWCR	826,4 →1353,6, 1197,5, 650,3	26,6
	YCITVTNPVGEDSATLHVR	1066,5 → 1280,7, 1183,6, 783,5	34,1
	VAGAALPCAPAVK,	612,8 → 855,5, 742,4, 645,3, 414,3	20,0
Myosin-binding protein H	AISASGTSDPATLEQPVLIR	1013,5 → 1236,7, 1139,7, 1068,6, 597,4	32,4
Pyruvate kinase	CLAAALIVMTESGR	746,4 →1005,5, 892,5, 779,4	24,1
	QPAHDAWAEDVDLR	811,9 → 1494,7, 1074,5, 1003,5, 817,4	26,2
Pyruvate kinase (P00548.2)	EPADAMAAGAVEASFK	782,9 → 1152,6, 950,5, 879,5, 950,5, 808,4	25,3
M-protein	GNYTFEIFSDK	660,8 → 986,5, 885,4, 738,4	21,5
	FWIQAESLSPNSTYR	899,9 → 1153,5, 1024,5, 937,5, 737,4	28,9
Troponin I	SAMLQLAVTEIEK	716,9 → 902,5, 789,4, 718,4	23,2
Creatine kinase Mtype	DLFDPVIQDR	609,3 → 842,5, 727,4, 630,4	19,9
	LSVEALNSLEGEFK	768,4 → 1036,5, 923,4, 809,4	24,8
β-enolase	LAQSHGWGVMVSHR	782,9 → 1028,5, 971,5, 785,4	25,3
	LAMQEFMVLPVGAASFHDAMR	1161,0 → 1371,6, 1258,6, 1161,5	37,0
Сухое молоко (коровье)			
α-s1-casein	YLGYLEQLLR	634,4 → 991,6, 771,5, 529,3	20,7
	FFVAPFPEVFGK	692,9 → 1090,6, 676,4, 450,3	22,5
Меланж			
Ovotransferrin	FFSASCVPGATIEQK	821,4 → 942,5, 843,5, 618,3	26,5
	GAIEWEGIESGSVEQAVAK	980,5 → 1274,7, 1104,6, 888,5	31,4

Название белка	Последовательность маркерного пептида	Материнский ион (*m/z*), дочернии ионы (*m/z*)	Энергия диссоциации (CE), В
lysozyme C	NTDGSTDYGILQINSR	877,4 → 1366,7, 900,5, 730,4	28,2

Среди идентифицированных видоспецифичных маркеров для каждого вида мяса были выбраны лучшие кандидаты с учетом следующих факторов: высокая распространенность, хорошее отношение сигнал / шум при низких концентрациях, высокая специфичность, отсутствие пропущенных расщеплений и сайтов расщепления, специфичных для трипсина на обоих концах [34].

Данные ВЭЖХ / ESI-MC были получены с использованием программного обеспечения MassHunter B.04.00 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). Калибровочные кривые были построены с использованием расчета площади полного ионного тока (TIC) (сумма двух отслеживаемых переходов), так и сигнала первого перехода (наиболее интенсивного), что дало полностью сопоставимые результаты.

Расчет пределов обнаружения и количественного определения

Пределы обнаружения и количественного определения определялись по калибровочным кривым в соответствии с руководящими принципами ОФС.1.1.0012.15 (Валидация аналитических методик) с использованием формул:

$$LOD = 3.3 \times \frac{S_y}{S}, LOQ = 10 \times \frac{S_y}{S},$$

где Sy - стандартное отклонение отклика,

S- наклон калибровочной кривой.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Применение аспектов биомоделирования МС параметров протеотипических пептидов

С целью выявления пептидов функциональности и аутентификации мясного сырья и готовых мясных продуктов вначале были проведены работы по определению белковых маркеров и получены спектры пептидов на примере количественной идентификации маркерных пептидов мышечной ткани говядины, свинины и птицы (курица), как основного сырья, используемого при переработке. Данные работы также направлены на расширение научного и технологического базиса по выявлению и идентификации ткане- и видоспецифичных веществ белково-пептидной природы в мясных продуктах.

Были проанализированы модельные образцы мясного фарша, паштетов, приготовленные из нескольких видов, готовая мясная продукция. Белки экстрагировали и расщепляли трипсином (подробности в экспериментальном разделе), а пептидные смеси анализировали методом ВЭЖХ / ESI-МС. Анализ белков проводили с помощью биомоделирования в программе Skyline [143], способной проводить теоретическое расщепление белков и выводить список мониторинга выбранных реакций (SRM) с заданными МС характеристиками для каждого пептида. Основные белки, выбранные для аутентификации мясных продуктов из разных видов животных представлены: миоглобином и лактатдегидрогеназой, структурными единицами миозина, триозофосфат-изомеразой.

Для выбора потенциальных маркерных пептидов были отобраны пептиды (таблица 3), длина которых превышала шесть аминокислот, в соответствии с ранее указанными протоколами [32, 136]. Таким образом, длина пептида обеспечивает видоспецифичность мышечного белка. Затем пептидные ионы-кандидаты были подвергнуты перекрестной проверке на хроматограмме других видов мяса, и были отобраны только те пептиды, которые присутствовали в одном типе мяса. Кроме того, для обеспечения специфичности пептида был выполнен поиск в базе данных

BLAST (англ. *Basic Local Alignment Search Tool* - средство поиска основного локального выравнивания) представленный на рисунке 7. Среди идентифицированных видоспецифичных маркерных пептидов два пептида для каждого вида мяса были окончательно выбраны с учетом следующих факторов: высокая распространенность, хорошее отношение сигнал / шум при низких концентрациях, высокая специфичность, отсутствие пропущенных расщеплений и сайтов расщепления, специфичные для трипсина на обоих концах.

sp|P02192|MYG_BOVIN Myoglobin OS=Bos taurus OX=9913 GN=MB PE=1 SV=3
Sequence ID: Query_79601 Length: 154 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 154 Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
276 bits(705)	6e-102	Compositional matrix adjust.	136/154(88%)	142/154(92%)	0/154(0%)

```
Query  1    MGLSDGEWQLVLNVWGKVEADVAGHGQEVLIRLFKGHPETLEKFDKFKHLKSEDEMKASE  60
            MGLSDGEWQLVLN WGKVEADVAGHGQEVLIRLF GHPETLEKFDKFKHLK+E EMKASE
Sbjct  1    MGLSDGEWQLVLNAWGKVEADVAGHGQEVLIRLFTGHPETLEKFDKFKHLKTEAEMKASE  60

Query  61   DLKKHGNTVLTALGGILKKKGHHEAELTPLAQSHATKHKIPV YLEFISEAIIQVLQSKH  120
            DLKKHGNTVLTALGGILKKKGHHEAE+  LA+SHA KHKIPV YLEFIS+AII VL +KH
Sbjct  61   DLKKHGNTVLTALGGILKKKGHHEAEVKHLAESHANKHKIPV YLEFISDAIIHVLHAKH  120

Query  121  PGDFGADAQGAMSKALELFRNDMAAKYKELGFQG  154
            P DFGADAQ AMSKALELFRNDMAA+YK LGF G
Sbjct  121  PSDFGADAQAAMSKALELFRNDMAAQYKVLGFHG  154
```

Рисунок 7 – Сравнение белка миоглобина разных видов животных при помощи BLAST [144].

Для модельных образцов были выбраны еще три пептида, которые могут служить как потенциальные биомаркеры в методике количественного определения. Маркерным белком был установлен миоглобин. В говядине его содержится большое количество. Были установлены времена удерживания, MRM переходы и построены калибровочные кривые для данных пептидов.

Полученные результаты в первую очередь включают в себя выбор уникальных пептидов, которые наблюдаются в протеолитических перевариваниях трипсина, и не содержат аминокислот, которые подвержены химической модификации, на основе информации, присутствующей в таких базах данных, как пептидный атлас и база GPM (глобальная база для протеомов *Global Proteome Machine mrm.thegpm.org/thegpm-cgi/peak_search.pl.*). Во-вторых, эти пептиды

используются для определения оптимальных параметров регистрации MRM (таблица 3).

3.2. Маркерная идентификация пептидов

3.2.1. Маркерные пептиды говядины для определения состава мясных продуктов

На следующем этапе работ было проведено изучение биомаркеров для идентификации говядины (таблица 3). Хроматограммы SRM пептидных маркеров представлены на рисунке 8. Представлены наиболее интенсивные 4 пептида с значением сигнала 100-250*10^3 усл. ед. интенсивности на рисунке 8А. В области интенсивности 50*10^3 усл. ед. интенсивности на рисунке 8В указаны остальные пептиды. Данные хроматограммы получены для образца с концентрацией 16 % (мас. %), который был подвергнут термическому воздействию.

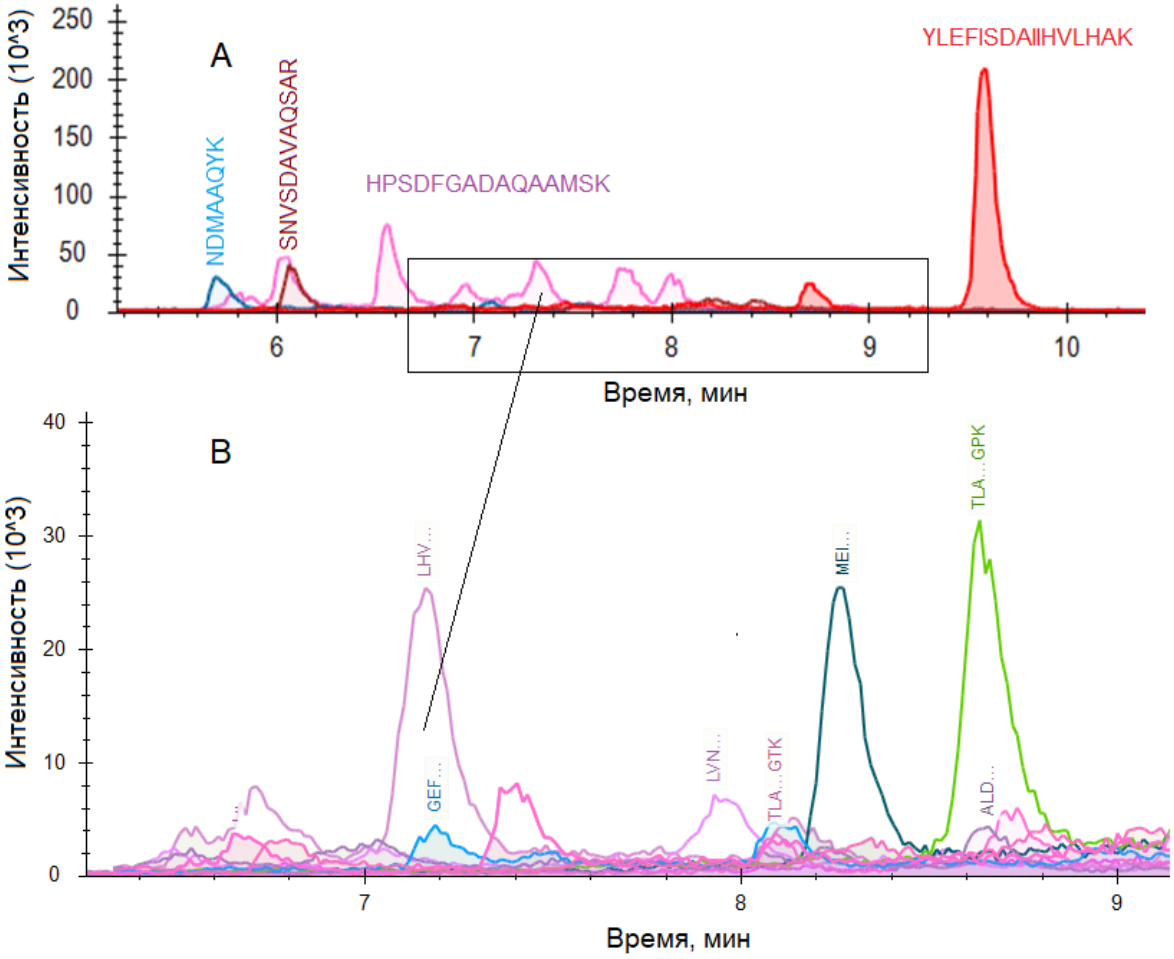


Рисунок 8 – Хроматограммы отобранных биомаркеров, идентифицирующих мышечную ткань говядины: А - основные пептиды, В - минорные пептиды.

Результаты мониторинга анализа данных приведены в таблице 4. Пептиды выстроены в порядке падения S/N относительно модельного образца с концентрацией мышечной ткани говядины 16% (мас. %), подвергнутому термическому воздействию.

Таблица 4 – Сравнение маркерных пептидов по характеристикам сигнал/шум для двух концентраций и двух режимов приготовления (без и с термообработкой) говядины.

Наименование маркерного белка	Последовательность протеотипического пептида	Модельные смеси 8,0% (мас. %) (говядины)		Модельные смеси 16,0% (мас. %) (говядины)	
		Без варки (S/N±SD)	Варка (S/N±SD)	Без варки (S/N±SD)	Варка (S/N±SD)
Myoglobin	**NDMAAQYK**	**12,50 ±2,45**	**24,61 ±4,82**	**11,53 ±2,64**	**127,66 ±12,51**
Triosephosphate isomerase	**SNVSDAVAQSAR**	**13,34±2,61**	**10,09±1,38**	**13,02±0,23**	**27,82±1,23**
Myoglobin	**YLEFISDAIIHVLHAK**	**3,24±0,64**	**7,79±0,76**	**4,64±1,97**	**24,06±7,58**
Myoglobin	HPSDFGADAQAAMSK расчет по 511 m/z (заморозка)	1,36±0,27	2,14±0,50	1,95±0,17	7,78±0,42
Myosin-2	MEIDDLASNVETISK	2,47±0,48	2,29±0,18	3,5±0,42	8,33±0,79
Myosin-1	TLALLFSGPASGEAEGGPK	1,20±0,23	2,15±0,21	1,55±0,10	8,32±1,85
Myoglobin	HPSDFGADAQAAMSK расчет по 511 m/z	3,70±0,73	2,91±0,34	1,94±1,66	7,43±2,05
Stress-induced-phosphoprotein	ALDLDSNC[+57.0]K	2,51±0,49	1,74±0,51	2,32±1,07	4,66±0,76
β-Hemoglobin	LHVDPENFK	2,82±0,57	2,35±0,23	4,05±0,61	5,30±0,39
Myosin light chain 2f	EASGPINFTVFLNMFGEK	1,31±0,26	1,24±0,12	1,98±0,72	5,09±0,87
Myoglobin	HPSDFGADAQAAMSK расчет по 766 m/z	2,89±0,51	1,68±0,16	4,96±1,76	2,57±0,05
Carbonic anhydrase 3	LVNELTEFAK	1,04±0,26	0,60±0,08	1,78±0,48	2,54±0,24
Carbonic anhydrase 3	GEFQLLLDALDK	1,36±0,22	0,15±0,12	1,93±0,45	2,42±0,20
Myosin-2	TLAFLFSGTPTGDSEASGGTK	5,00±0,84	4,35±0,43	4,49±0,45	1,87±0,21
L-Lactate dehydrogenase A chain	DLADEVALVDVMEDK	0,2±0,12	1,36±0,13	0,58±0,13	0,51±0,35

Данная таблица 4 показывает, что S/N выше всего у пептидов NDMAAQYK [146] и SNVSDAVAQSAR [145]. Так как в красном мясе содержится высокий уровень миоглобина, это обусловливает самое большое количество пептидных производных данного белка у говядины. Отношение S/N составляет выше 10 для всех типов образцов. Для пептида HPSDFGADAQAAMSK [12, 33; 145] проводился дополнительный поиск MRM. Использовались два родительских иона 766,8 m/z и 511,6 m/z. Наиболее значимым оказался ион 511.6 m/z. Интенсивность MRM по данной массе увеличилась на 40,0±7,4% по сравнению с ионом 766,8 m/z.

Проверялись влияние одного цикла заморозки/разморозки образца на интенсивность пептида HPSDFGADAQAAMSK (таблица 4). Для образцов, которые проходили термическую обработку, показатель S/N не изменился. Установлено, что один цикл заморозки/разморозки не влияет на большие концентрации (более 15% (мас. %)) мяса в образцах. При концентрациях меньше 10% (мас. %), падение интенсивности составило до 52,4±15,2%. Для пептидов ALDLDSNC[+57,0]K [20], DLADEVALVDVMEDK и GEFQLLLDALDK [12] была зафиксирована кросконтаминация при высоком содержание другого вида мяса (таблица 2) без использования говядины(рисунок 9).

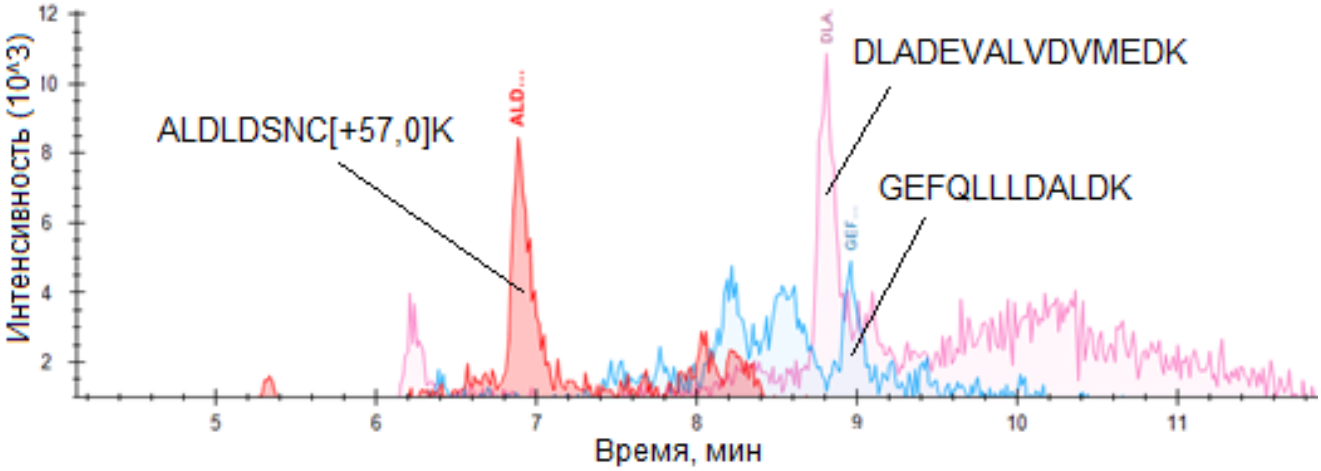


Рисунок 9 – Идентифицированные пептиды ALDLDSNC[+57,0]K, DLADEVALVDVMEDK и GEFQLLLDALDK в пробах, не содержащих говядину.

Некоторые пептиды не прошли пороговую оценку в рамки критерия S/N – выше трех. Пептиды, из белков миозинового ряда, такие как MEIDDLASNVETISK

[26] TLALLFSGPASGEAEGGPK [8, 26, 33] оказались чувствительны к термическому воздействию в образцах с содержанием мышечной ткани в 16% (мас. %). При более низких концентрациях S/N приближалось к 2-3. Не удалось подтвердить пептид DLADEVALVDVMEDK [12] во всех типах образцов. Показатель S/N по всем пробам составил не более 2-х. Проведя однофакторный дисперсионный анализ ANOVA было установлено значимое влияние температуры на интенсивность маркерных пептидов при концентрации 8% (мас. %) (мас. %) (p = 0,021) и 16,0% (мас. %) (p = 0,013) говядины.

Разработанная методика позволила одновременно идентифицировать и сравнивать до 13 биомаркеров пептидов говядины. Используя критерий S/N, можно было сравнить пептидные маркеры на подлинность для сырого и термически обработанного мясного продукта. Считались успешными кандидатами, у которых отношение сигнал / шум было выше 3. Из анализа видоспецифических маркерных пептидов были отобраны три пептида (**NDMAAQYK** и **YLEFISDAIIHVLHAK** из миоглобина и **SNVSDAVAQSAR** из белка триозофосфат-изомеразы) для определения мышечной ткани в говядине с учетом следующих факторов: высокая распространенность в мышечных тканях (> 50*10^3 усл. ед. интенсивности), хорошее соотношение сигнал / шум при низких концентрациях (S\N> 10), высокая специфичность и наличие сайтов расщепления, специфичных для трипсина, на обоих концах белковой цепи. Для образцов с двумя уровнями концентрации и при тепловом воздействии (варки) отношение S/N были установлены выше 10. Более детально изложено в работе [147].

3.2.2. Маркерные пептиды свинины для определения состава мясных продуктов

Был проведен сравнительный анализ протеотипических пептидов для идентификации мышечной ткани свинины на модельных образцах (таблица 2). Хроматограммы SRM пептидных маркеров представлены на рисунке 10. При использовании данной методики лучше всего определены три наиболее интенсивных по высоте пептида с значением сигнала 300-600*10^3 усл. ед. интенсивности., что в 8,4±4,2 раза больше, чем остальных биомаркеров,

полученных в результате работы (рисунок 10А). В области 10-50*10^3 усл. ед. интенсивности на рисунке 10В указаны остальные пептиды. Данные получены в образце концентрацией 50,0% (мас. %) мышечной ткани свинины, подвергнутому термическому воздействию.

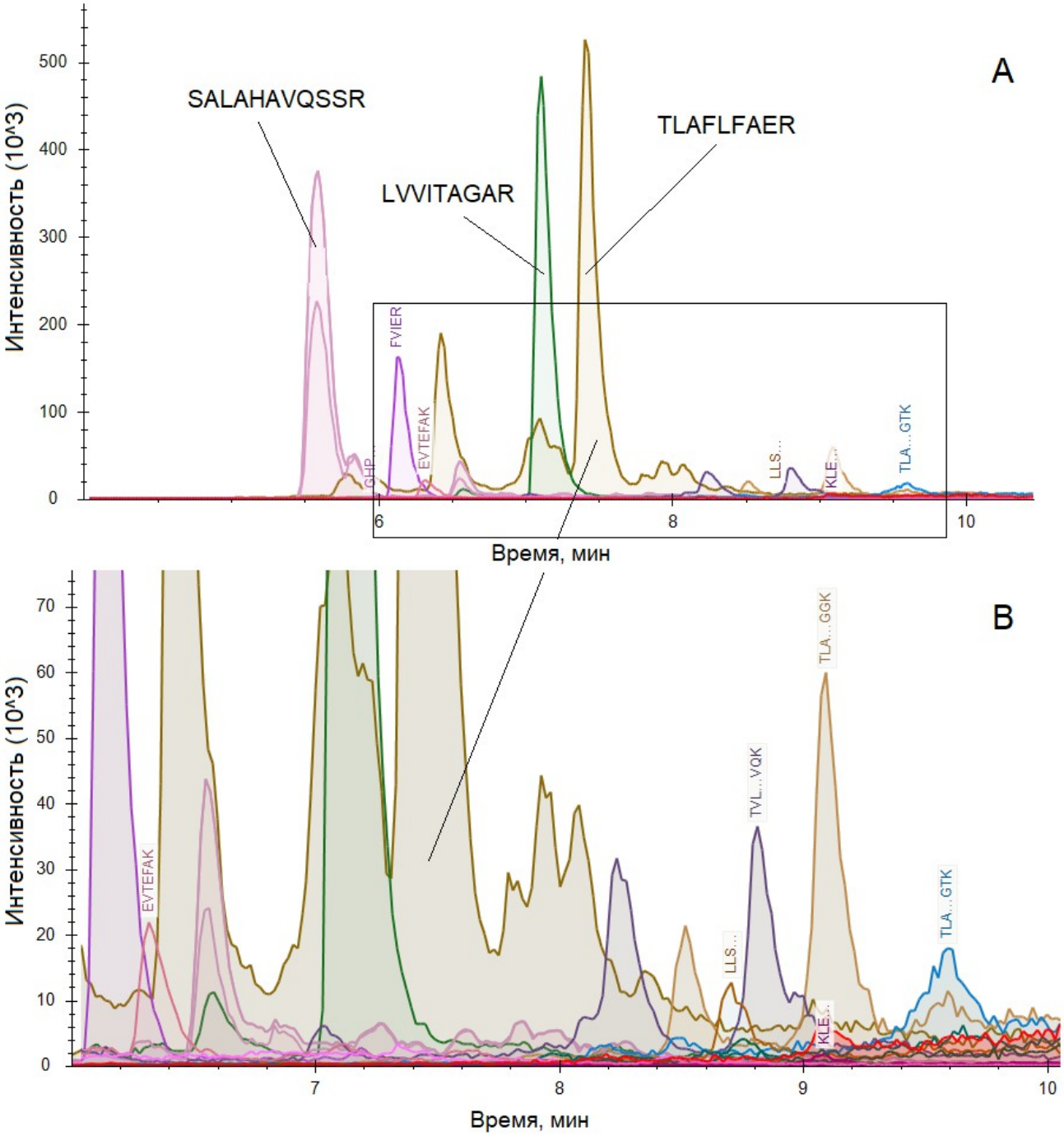


Рисунок 10 – Хроматограммы выбранных биомаркеров, отвечающих за идентификацию мышечной ткани свиньи: А - основные пептиды, В - минорные пептиды.

Результаты мониторинга анализа данных приведены в таблице 5. Данные показывают, что S/N выше у пептидов SALAHAVQSSR [21] FVIER и LVVITAGAR [6]. Отношение S/N составило выше 10 для всех типов образцов. Данные пептиды были выделены из белков группы миозина, альбумина и лактатдегидрогеназы. Однако пептид FVIER был обнаружен ($p < 0,05$) при анализе образца говяжьей сердечной мышцы, выбранного контрольным образцом для проверки селективности протеотипических пептидов. Измеренная площадь пика составила 60% от площади пика образца фарша свинины с концентрацией 50,0% (мас. %). Таким образом, пептид FVIER не может быть выбран, как однозначный маркер для свиного мяса, ввиду его нахождения у других видов животных.

Таблица 5 – Сравнение маркерных пептидов относительно характеристики сигнал/шум для двух концентраций и двух режимов приготовления (без и с термической обработкой).

Наименование маркерного белка	Последовательность маркерного пептида	Модельные смеси 8,0% (мас. %) (свинины)		Модельные смеси 50,0% (мас. %) (свинины)	
		Без варки (S/N±SD)	Варка (S/N±SD)	Без варки (S/N±SD)	Варка (S/N±SD)
Myosin-1	**SALAHAVQSSR**	**63,87 ±12,52**	**74,52 ±14,61**	**121,38 ±2,01**	**126,47 ±6,38**
	TLAFLFTGAAGADAEAGGGK	2,34 ±0,46	1,55 ±0,30	2,10 ±0,85	4,85 ±1,13
Myosin-2	TLAFLFSGAQTGEAEAGGTK	1,17 ±0,23	2,12 ±0,42	2,08 ±0,29	2,11 ±0,51
Myosin-4	**TLAFLFAER**	**13,77 ±2,70**	**21,55 ±4,22**	**32,73 ±10,86**	**50,05 ±16,21**
	KLETDISQIQGEMEDIVQEAR	2,69 ±0,53	3,39 ±0,66	7,15 ±1,43	7,27 ±1,43
	HKYEETQAELEASQK	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	4,11 ±1,82
Myosin-7	LLSNLFANYAGADTPVEK	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,52 ±0,37	2,93 ±0,40
Serum albumin	**FVIER**	38,36 ±7,52	53,22 ±10,43	63,77 ±8,01	53,01 ±23,98
	EVTEFAK	7,78 ±1,53	6,34 ±1,24	4,32 ±0,76	6,40 ±2,20
	TVLGNFAAFVQK	8,95 ±1,75	5,78 ±1,02	4,18 ±0,54	4,94 ±0,99

Lactate dehydrogenase	**LVVITAGAR**	**28,64 ±5,61**	**27,99 ±5,49**	**36,47 ±20,20**	**84,60 ±0,61**
Trifunctional enzyme subunit α	FAGGNLDVLK	5,64 ±1,11	5,76 ±1,13	11,59 ±0,46	8,78 ±3,79
β- Enolase	NYPVVSIEDPFDQDDWK	5,01 ±0,98	3,40 ±0,67	7,20 ±2,34	13,94 ±0,66
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	WGDAGATYVVESTGVFTTMEK	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	3,40 ±1,81	8,12 ±2,78
Myoglobin	GHHEAELTPLAQSHATK	6,02 ±1,18	0,00 ±0,00	3,99 ±2,36	4,22 ±2,16
	HPGDFGADAQGAMSK	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	2,22 ±1,14	7,13 ±1,79
	GHPETLEK	3,62 ±0,71	1,56 ±0,31	2,57 ±0,62	1,26 ±0,06
	YLEFISEAIIQVLQSK	0,00 ±0,00	7,23 ±1,42	4,04 ±0,82	17,55 ±8,31
β-Hemoglobin	FFESFGDLSNADAVMGNPK	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	1,32 ±0,37

Можно выделить ряд пептидных маркеров, для которых показатель S/N был ниже порогового значения при концентрации 8,0% (мас. %). Это относится к пептидам, выделенных из миоглобина. Маркер YLEFISEAIIQVLQSK, был идентифицирован только при варке образцов с показателем S/N на уровне 7,23 ±1,42. При термической обработке показатель S/N в 4,34±2,32 раза выше, чем без нее. Такая тенденция характерна и для пептидов GHHEAELTPLAQSHATK и HPGDFGADAQGAMSK. Можно предположить, что данный ряд маркеров возможно использовать для термообработанной продукции. Даже на уровне 8,0% (мас. %) свинины не были зафиксированы такие пептиды как WGDAGATYVVESTGVFTTMEK LLSNLFANYAGADTPVEK. При увеличении концентрации данные пептиды уже были идентифицированы. Для пептидов VNVDEVGGEALGR, EVTEFAK, FVIER TVLGNFAAFVQK была зафиксирована кросконтаминация при высоком содержание другого вида мяса без использования свинины (рисунок 11).

Идентифицированные пептиды в образце сердечной мышцы говядины получены из сывороточного альбумина и бета-гемоглобина, где концентрация данных типов белков максимальна. Многие пептиды не прошли соответствие критерию S/N выше трех. Пептиды, представленные из белков миозина, такие как TLAFLFTGAAGADAEAGGGK [26] LLSNLFANYAGADTPVEK [8, 26, 33] и пептиды FFESFGDLSNADAVMGNPK, VNVDEVGGEALGR из бета-гемоглобина [12] не удалось идентифицировать во всех типах образцов. Данные маркеры могут быть чувствительны к циклам заморозки/разморозки и длительному хранению даже при минусовой температуре. Показатель S/N по всем пробам составил не более 1 единицы. Проведя однофакторный дисперсионный анализ, было установлено значимое влияние температуры на интенсивность маркерных пептидов при двух концентрациях 8,4% (мас. %) (p = 0,037) и 50,0% (мас. %) (p = 0,002). Это может быть связано с доступностью белковых молекул для ферментативного гидролиза при тепловой обработке. Эти данные необходимо будет учитывать при выборе стандартов для разработки количественных методик.

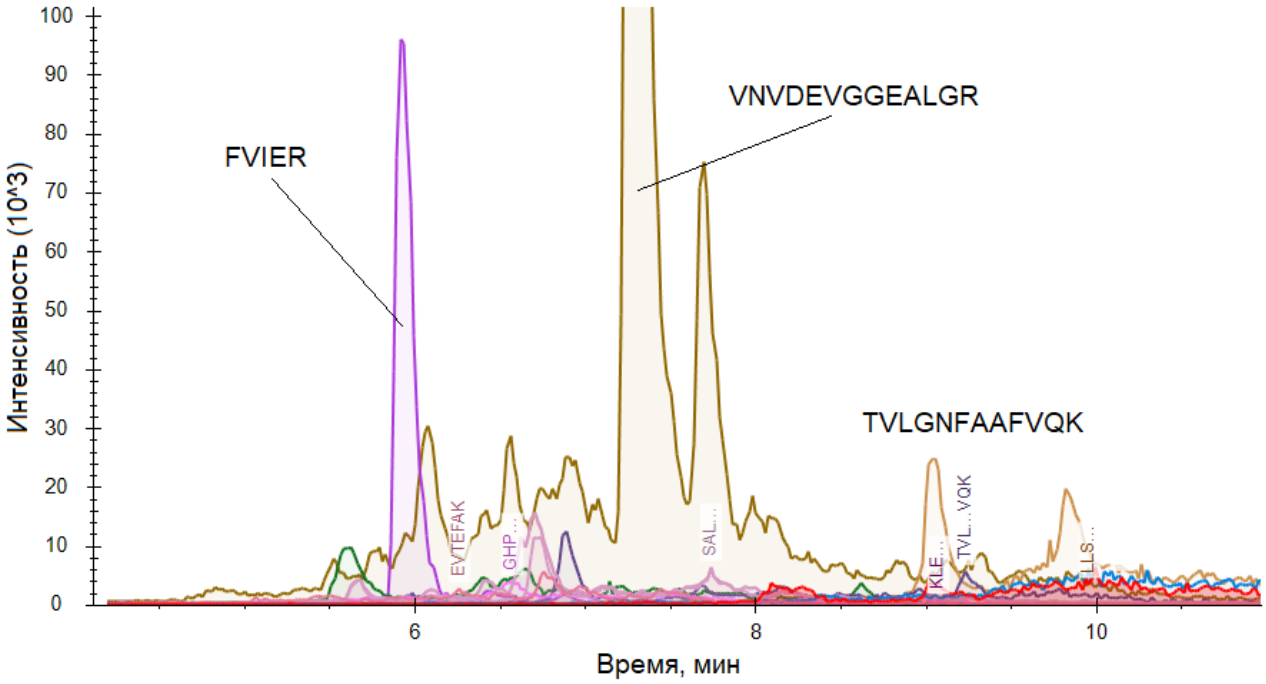


Рисунок 11 – Идентифицированные пептиды VNVDEVGGEALGR, EVTEFAK, FVIER TVLGNFAAFVQK в пробах, не содержащих свинину.

Разработанная методика позволила одновременно выявить и сравнить до 20 биомаркерных пептидов свинины за короткое время ─ около 25 минут. Из анализа видоспецифичных биомаркеров окончательно были определены три пептида (**SALAHAVQSSR** и **TLAFLFAER** из миозина и **LVVITAGAR** из белка лактатдегидрогиназы) для идентификации мышечной ткани свинины. Для образцов с двумя уровнями концентрации и в условиях варки при 72 ℃ отношение S/N были установлены выше 10. Также хочется отметить, что нестабильно себя показали маркеры из белков миоглобина, бета-гемоглобина и *Trifunctional enzyme subunit α*, которые не рекомендуется использовать в количественных исследованиях.

3.2.3. Маркерные пептиды мяса птицы (курица)

Пептиды, представленные в недавнем обзоре [34], были выбраны для сравнения потенциальных биомаркеров. К ним относятся более 20 термостойких маркеров для курицы с 2010 по 2019 год. Такое большое количество маркеров связано с тем, что куриное мясо является самым потребляемым в мире [148]. Куриное мясо часто используют как замену более дорогим видам мяса. В таблице 2 перечислены белки, такие как креатинкиназа М, миозин, β-енолаза, М-белки и пируваткиназа. Они являются источником термостабильных пептидов (таблица 2).

Для цепей миозина были проанализированы девять термостойких пептидов. Семейство миозинов является наиболее репрезентативным семейством пептидов в белом мясе из-за его роли в сокращении мышц [17]. Можно выделить два маркера на рисунке 6. Это пептид DQGTFEDFVEGLR, показавший интенсивность сигнала в (10−30)*10^3 усл. ед. интенсивности. Эти результаты согласуются с исследованиями Sentandreu и соавт. (2010) и Wang и соавт. (2018), где был обнаружен только этот пептид [20, 34]. Вторым маркером является пептид VAGAALPCAPAVK [14, 26]. Его интенсивность составляла в диапазоне (10−110)*10^3 усл. ед. интенсивности. Это значение оказалось самым высоким среди всех проанализированных пептидов. Это новое значение может сместить акцент на более детальное изучение пептида VAGAALPCAPAVK.

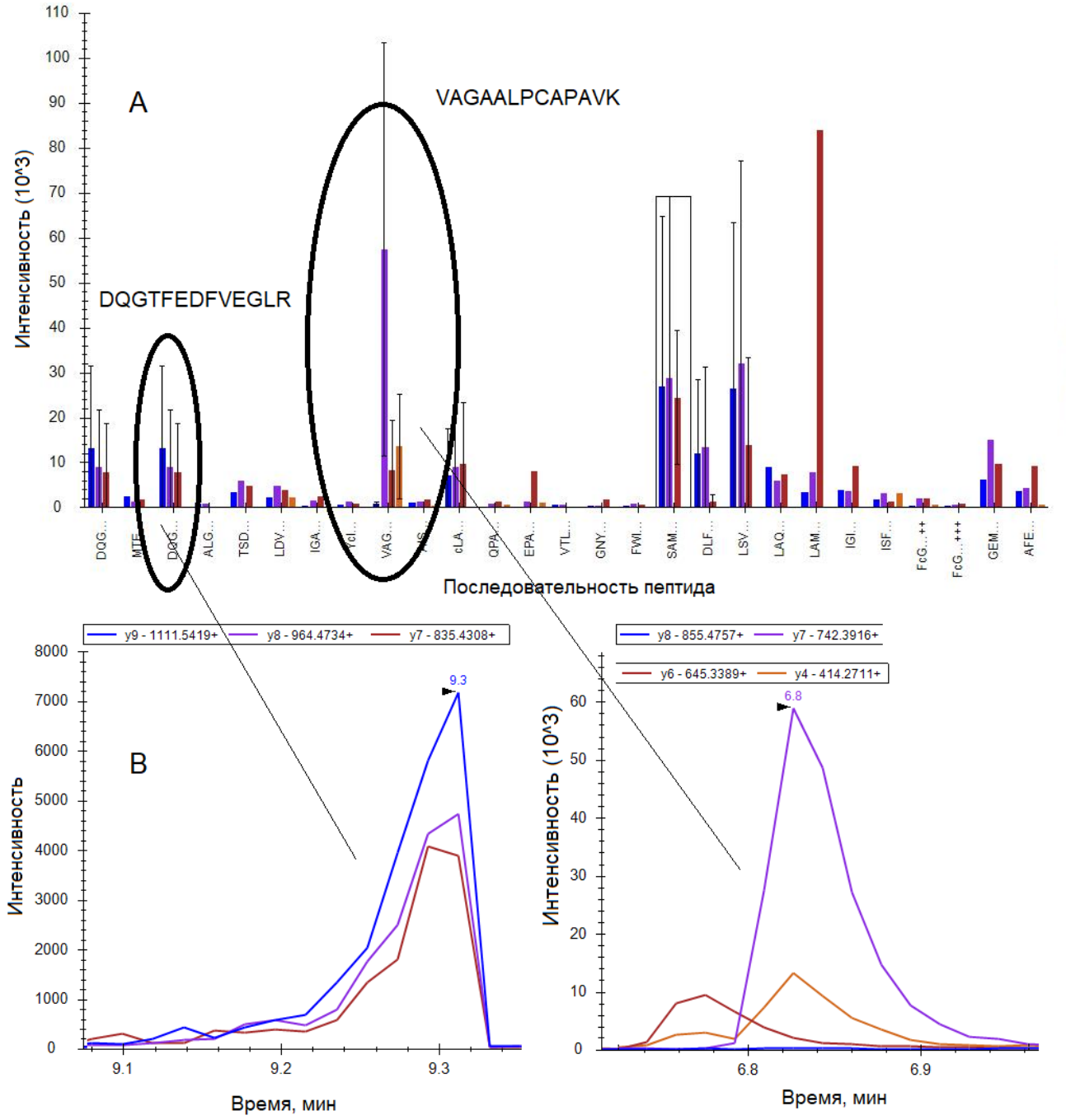


Рисунок 12 – Анализ протеотипических пептидов для мышечной ткани мяса кур: А - сравнение площадей маркерных пептидов для детектирования мяса кур по всем SRM переходам для исследуемых образцов; В - время удерживания, переходы и масс-спектр дочерних ионов для видоспецифичных пептидов DQGTFEDFVEGLR и VAGAALPCAPAVK.

Пептиды SAMLQLAVTEIEK, DLFDPVIQDR, LSVEALNSLEGEFK и LAMQEFMVLPVGAASFHDAMR показали интенсивность сигнала (10−90)*10^3 усл. ед. интенсивности. Однако разброс интенсивности определяемых переходов

(при p< 0,05) составлял более 50% для этого ряда маркеров (рисунок 6). Это может сказываться на результатах во время выполнения ферментного гидролиза и подготовки проб, и результаты анализа не смогут пройти порог сходимости в 25 %. Поэтому на данном этапе работ рассматривается только пептид **VAGAALPCAPAVK**, как маркер для количественной оценки, удовлетворяющий вышеперечисленным критериям.

3.2.4. Белковых ингредиентов, применяемых в мясном производстве

На данном этапе работы были определены биомаркеры других ингредиентов не мышечной природы в готовых продуктах. Колбасный фарш в оболочке, содержащий белковые ингредиенты (*Образец №6)* и тот же образец после термообработки (*Образец №9)* представлены на рисунках 13 и 14. Были выбраны три маркера на меланж и два на сухое молоко (таблице 3, гл. 2, п. 2.4). Содержание меланжа определено при добавлении в продукт на уровне 1.5% (мас. %) и сухого молока 2.5% (мас. %). Образцы также в составе содержали говядину и свинину. Для обнаружения перекрестной контаминации параллельно анализировались образцы, не содержащие данных ингредиентов.

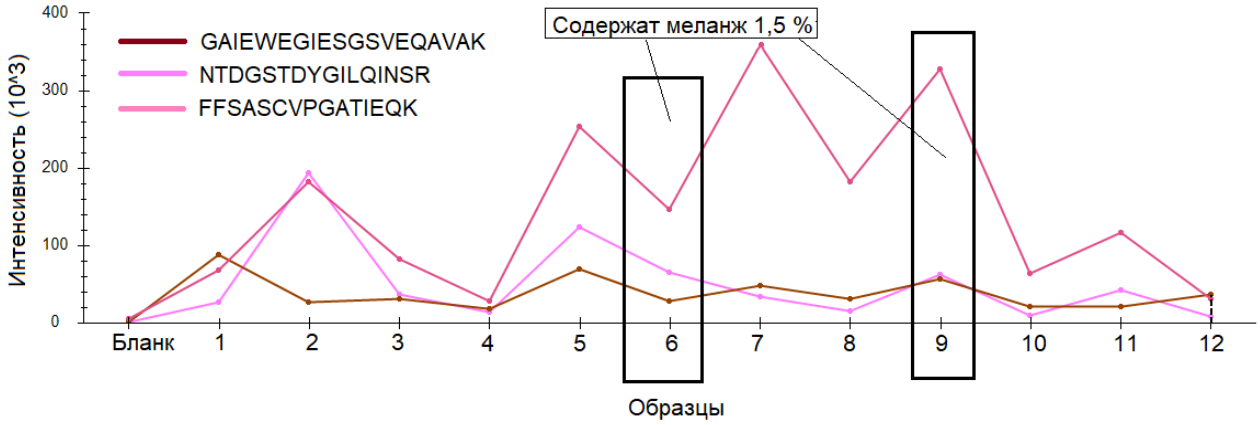


Рисунок 13 – Сравнение площадей интенсивности всех масс фрагментов маркерных пептидов меланжа для исследуемых образцов.

В результате работ маркеры для обнаружения в составе меланжа, представленные на рисунке 13 из белков *Ovotransferrin* и *lysozyme C* показали кросс-контаминацию и не смогли быть идентифицированы в образцах,

содержащих данный ингредиент. Концентрация добавленного компонента оказалась ниже LOQ методики.

Для идентификации наличия сухого молока были выбраны два биомаркера из белка *α-s1-casein*. Для пептида YLGYLEQLLR были получены все SRM переходы для термообработанного продукта. Площадь пика для кривой составила 4,5 * 10^6 усл. ед. интенсивности (рисунок 14). При условии линейного снижения интенсивности сигнала возможно определение сухого молока до уровня в 0,05% (мас. %). Однако в продукте, не подвергающимся термической обработке с той же концентрацией добавки в 2.5% (мас. %) было заметное снижение интенсивности в 1,4 раза для данного маркерного пептида (рисунок 14). Это говорит, о доступности данного пептида в денатурирующих условиях. Пептид **YLGYLEQLLR** хорошо подойдет для количественной оценки сухого молока в мясных продуктах вареных.

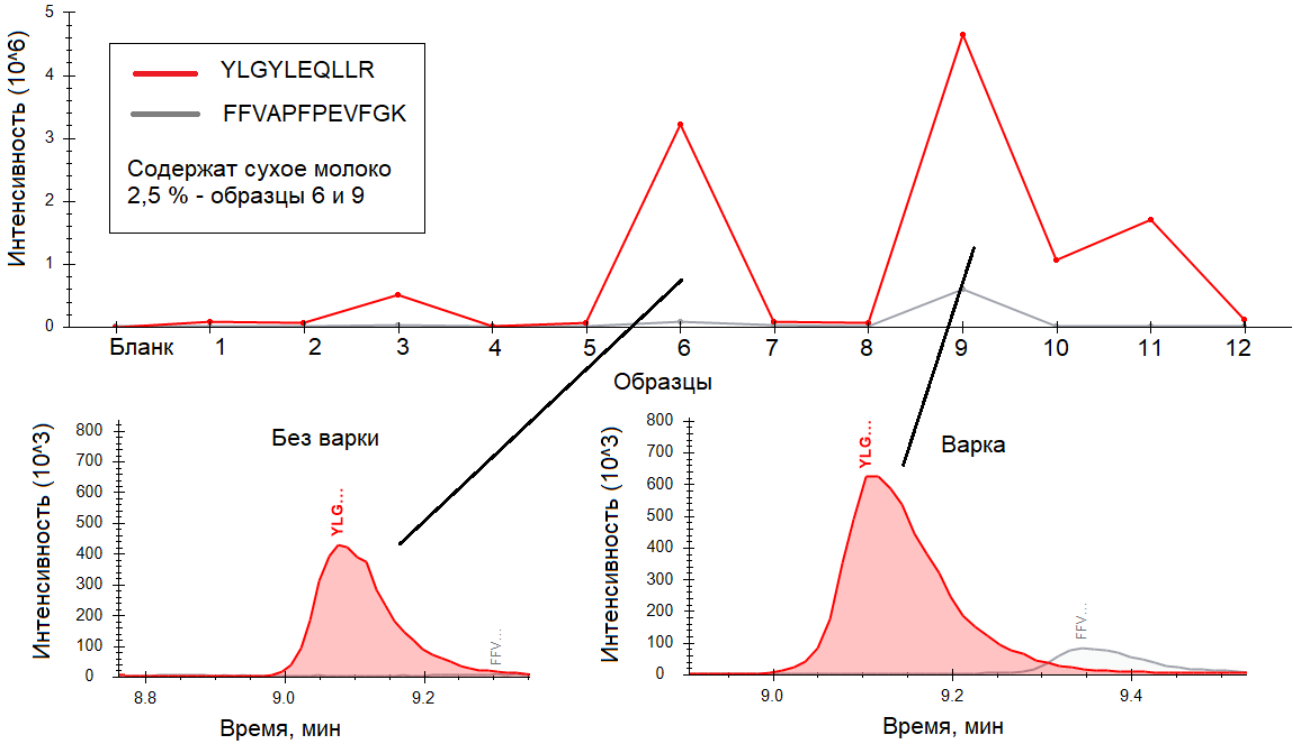


Рисунок 14 – Сравнение площадей по всем массам фрагментов для пептида YLGYLEQLLR и FFVAPFPEVFGK в исследуемых образцах.

Для второго пептида FFVAPFPEVFGK представленного на рисунке 14 были получены все SRM переходы только для термообработанного колбасного фарша в оболочке. Соответственно данный маркер может применяться для анализа колбасных фаршей, прошедших термическую обработку.

3.3. Проверка селективности протеотипических пептидов свинины по типу ткани

Целью данного этапа работы стало изучение состава мясных продуктов, содержащих, помимо мышечной, другие типы тканей: гладкая мускулатура внутренних органов (аорты) и сердечную мышцу. Необходимо было установить, присутствуют выбранные маркерные пептиды (таблицы 2, 5) для мышечной ткани свинины в других типах ткани для предотвращения намеренной подмены основного сырья другим типом ткани в составе готового термообработанного мясного продукта [149].

После биоинформационной обработки результатов в свином миокарде были обнаружены 7 пептидов, для которых сигнал/шум был выше 20. Самую высокую интенсивность показал пептид, имеющий последовательность VNVDEVGGEALGR (S/N – 73,10±5,3) из белка *β-Hemoglobin*. Для свиных аорт были установлены два маркерных пептида TVLGNFAAFVQK (S/N – 53,51±2,4) и EVTEFAK (S/N – 31,69±4,1) из сывороточного альбумина. Также были проанализированы инновационные мясные консервы «Здоровое сердце» (ЗС) и консервы мясные «Сердце свиное в собственном соку». В консервах были обнаружены 6 различных белков (таблица 6), для которых маркерные пептиды показали сигнал/шум выше 3 (при $p<0.05$). Остальные пептиды не прошли порог достоверной детекции в 3 едины по S/N, и были исключены из таблицы 6.

Таблица 6 – Сравнение маркерных пептидов относительно характеристики сигнал/шум для двух образцов готовой продукции.

Название белка	Последовательность маркерного пептида	Паштет ЗС, (S/N±SD)	Консервы, (S/N±SD)
β-Гемоглобин	FFESFGDLSNADAVMGNPK	11,53±3,36	9,30±4,16
Миозин-2	TLAFLFSGAQTGEAEAGGTK	8,73±0,54	7,07±2,15
Сывороточный альбумин	TVLGNFAAFVQK	8,54±0,75	6,35±0,95
	EVTEFAK	8,39±0,84	9,80±1,79
Митохондриальный трифункциональный белок	TVLGAPEVLLGILPGAGGTQR	6,76±1,14	15,63±2,77
Миозин-7	LLSNLFANYAGADTPVEK	3,03±0,61	6,00±0,98
β-Гемоглобин	VNVDEVGGEALGR	2,81±0,29	4,56±0,43

В готовом пищевом продукте самым интенсивным определен пептид, имеющий последовательность FFESFGDLSNADAVMGNPK (S/N – 11,53±3,36; 9,30±4,16) из белка β-Гемоглобин. Можно выделить для паштета ЗС маркер из сывороточного альбумина TVLGNFAAFVQK, специфичный для свиных аорт. Показатель по данному маркеру на 19% ниже в мясных консервах. Данные подтверждаются тем, что в сердцах и аортах много белков, составляющем кровеносную систему организма. Далее можно выделить ряд биомаркеров, подтверждающих наличие свинины. Получены маркеры из Миозина 2 и 7, сывороточного альбумина. Все 7 биомаркеров показали наилучшую детекцию и специфичность для исследованных образцов. Были проанализированы по более чем 20-ти протеотипическим пептидам различные виды ткани свинины (рисунок 15).

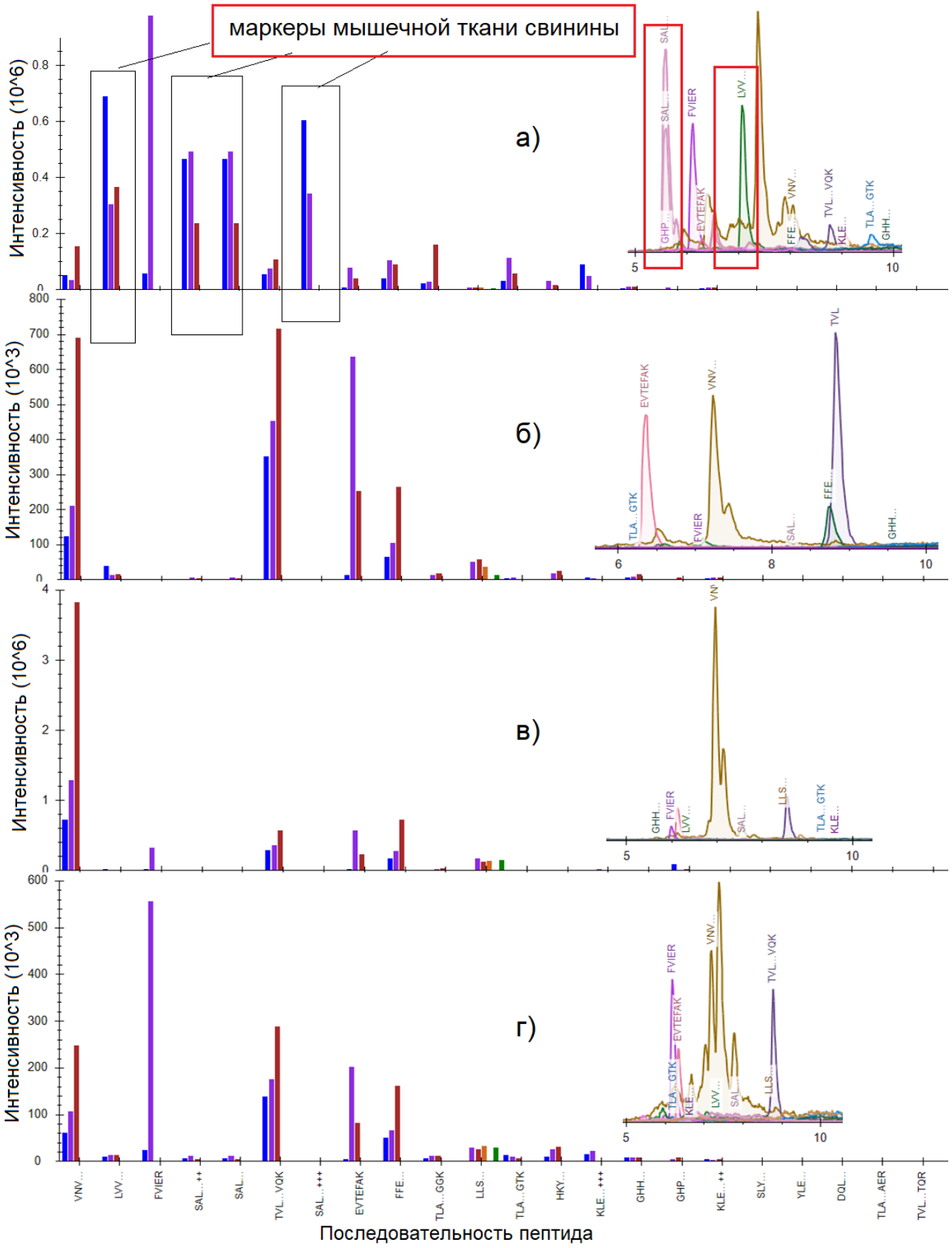


Рисунок 15 – Сравнение площадей маркерных пептидов свинины по всем SRM переходам для исследуемых образцов: а – рецептура 1 (таблица 2); б – гладкомышечная ткань свиных аорт; в – сердечной мышца свиная; г – паштет ЗС.

В ходе анализа не удалось обнаружить ранее выявленные маркеры мышечной ткани не в одном другом типе ткани (рисунок 15). Это говорит о селективности выбранных маркеров для аутентификации мышечной ткани свинины, а именно пептиды SALAHAVQSSR и TLAFLFAER из миозина и LVVITAGAR из белка лактатдегидрогеназы, сигнала которых нет на хроматограммах для гладкой мускулатуры и сердечной мышцы. При использовании такого подхода производитель не сможет применять сырье более низкого качество от того же вида животного.

3.4. Разработка методики содержания мышечной ткани в мясном сырье

Был апробирована ЖХ-МС методика для обнаружения и полуколичественного определения мышечной ткани двух различных видов мяса (говядина и свинина) в сложной биологической матрице, такой как бесструктурные фарши. После выделения белков и расщепления их трипсином для количественного определения были выбраны видоспецифичные пептидные маркеры для каждого типа животного. Метод был апробирован на модельных образцах смеси мышечной ткани двух видов животных (образцов *m.l.Dorsi* свинины и говядины) [145, 146, 150].

3.4.1. Выбор пар ионов и определение оптимизированных параметров MRM

Для определения наиболее интенсивного состояния заряда предшественника и наиболее распространенных фрагментных ионов для каждого пептида, их анализировали с использованием списков ионной пары MRM. Они содержали все возможные $[M + H]^+$ и $[M + 2H]^{2+}$ *b*- и *y* ионов пептидной последовательности как для состояний зарядов ионов-предшественников 2+, так и для 3+ при одновременном изменении напряжения в ячейке соударения (CE). Интенсивность сигнала от этих ионных пар для каждого пептида оценивалась для обеспечения выбора наиболее интенсивной пары предшественников и фрагментов, которые образуют наиболее чувствительную комбинацию для количественного

определения на основе MRM. Оптимизированные параметры MRM для 7 выбранных протеотипических пептидов с указанием материнского и дочерних ионов, напряжения в ячейке соударения, которые максимизируют генерацию каждого иона фрагмента, показаны в таблице 7.

Таблица 7 – Оптимизированные параметры MRM для 7 пептидов свинины (*Sus scrofa*) и говядины (*Bos taurus)*.

Пептид	вид животного	Время удерживания (мин)	Материнский ион (m/z)	Дочерние ионы (m/z)	Энергия соударения
HPSDFGADAQAAMSK	*Bos taurus*	6,3	511,6	635,3; 507,3; 641,3	13,6
SNVSDAVAQSAR	*Bos taurus*	5,8	602,8	904,4; 702,4; 532,3	19,7
HPGDFGADAQGAMSK	*Sus scrofa*	6,8	496,9	621,3; 493,2	13,1
THVSEAVAQSTR	*Sus scrofa*	5,5	429,2	562,3; 491,3; 625,3	10,7
YLEFISDAIIHVLHAK	*Bos taurus*	5,4	623,7	796,9	17,7
NDMAAQYK	*Bos taurus*	8,2	470,7	711,3	15,6
YLEFISEAIIQVLQSK	*Sus scrofa*	6,1	627,7	815,5	17,8

3.4.2. Проверка специфичности методики

Для выбора наиболее чувствительной ионной пары MRM для каждого пептида и включения в конечный мультиплексный метод MRM, были выбраны три наиболее интенсивные пары ионов MRM (определено прямым анализом ввода пробы) затем тестировали в условиях ВЭЖХ-МС анализа. Все три ионных перехода MRM для каждого пептида использовались для подтверждения идентичности. Это также позволило определить их соответствующие времена удерживания (рисунок 16).

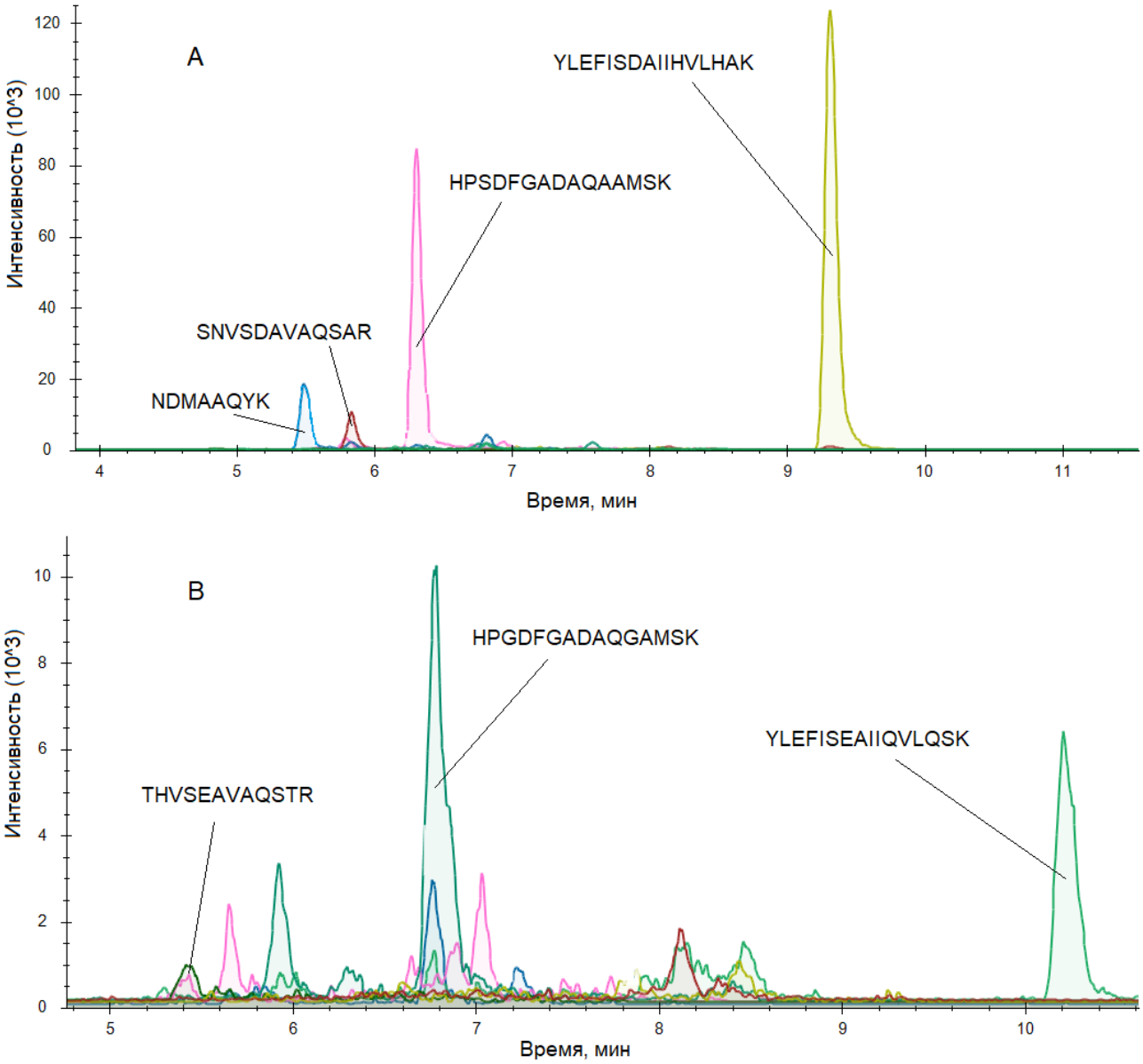


Рисунок 16 – Хроматограммы для определения мышечной ткани основного мясного ингредиенты: А – говядина; В - свинина.

Чтобы максимизировать емкость аналита и пропускную способность метода мультиплексирования MRM, было сосредоточено внимание на минимизации количества используемых пар ионов MRM (рисунки 17, 18). Была предпринята попытка обеспечить выбор ионных пар MRM, которые не содержали матричных помех от соэлюирующих ионов. В анализах MRM вместе с подбором трех критериев, специфичных для аналита (ион-предшественник m/z, фрагмент-ион m/z и время удерживания), достигается высокая специфичность каждой ионной пары MRM. Целесообразно использовать только SRM, включающие только 2х зарядные

y-ионы с получением дочерних ионов большей m/z, обеспечивающие максимальную величину аналитического сигнала (таблица 7).

Для каждого опытного образца отслеживались SRM для всех видов (рисунки 17, 18), чтобы обеспечить чувствительность метода (каждый вид имеет свой пептидный маркер) и селективность (только специфический маркерный пептид присутствует в каждом виде) (Приложение В).

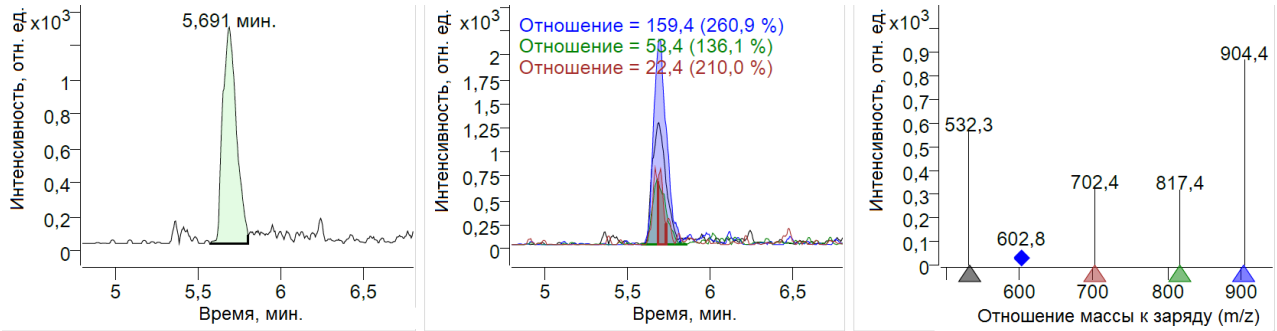


Рисунок 17 – Хроматограммы видоспецифического пептида **SNVSDAVAQSAR** говяжьей лактатдегидрогеназы с указанием времени удерживания (5.691 мин.) и **SRM** переходами выбранного иона 602,8 m/z.

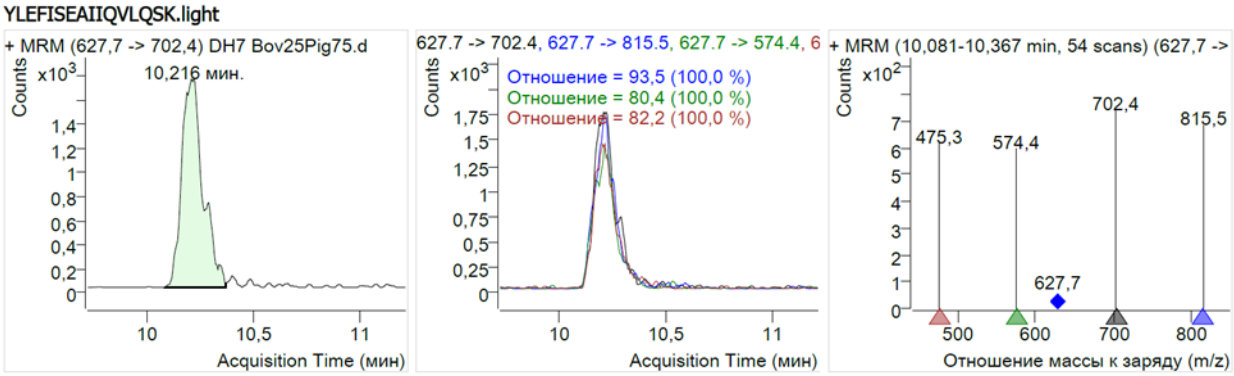


Рисунок 18 – Хроматограммы видоспецифического пептида **YLEFISEAIIQVLQSK** свиного миоглобина с указанием времени удерживания (10.216 мин.) и **SRM** переходами выбранного иона 627,7 m/z.

Все идентифицированные маркерные пептиды были повторно проанализированы в масс-спектрометре с тройным квадруполем для повторного подтверждения их последовательности. Два из четырех маркерных пептида были проанализированы на основе саркоплазматического белка миоглобина. Так как наибольшее содержание миоглобина содержится в красном мясе, что является

предпосылкой самого большого количества производных пептидов миоглобина у говядины. Маркерные пептиды свинины (HPGDFGADAQGAMSK и THVSEAVAQSTR) были выбраны для тех же белков, что и в говядине при количественной оценке. Но их содержание в свинине оказалось в разы меньше, чем в говядине.

Пептид миоглобина HPGDFGADAQGAMTK ранее использовался для обнаружения конины в свежем мясе [136]. Обнаружив данный фрагмент в аминокислотной последовательности миоглобина коровы, был использован пептид HPSDFGADAQAAMSK, отличающийся несколькими фрагментами. Данный пептид показал специфичность и не обнаруживался в пробе, содержащий только свинину. Для пептидов (THVSEAVAQSTR, SNVSDAVAQSAR) лактатдегидрогеназы в пробах свинины и говядины соответственно сигнал был намного ниже, чем для пептидов миоглобина.

3.4.3. Количественная оценка видов мяса

После выбора маркерных пептидов для каждого из исследуемых видов эти пептиды были проанализированы, с целью установления пределов обнаружения (LOD) и количественного определения метода (LOQ), а также линейность ответа при 5% (мас. %) содержании мышечной ткани говядины в смеси 95% (мас. %) свинины. Для этого в хроматограммах были интегрированы площади маркерных пептидов (сумма трех отслеживаемых переходов). Соотношение между площадью каждого маркерного пептида и площадью общего пептида было вычислено для нормализации данных и во избежание различий из-за возможных вариаций в эффективности экстракции белка, активности фермента и других факторов. Калибровочные кривые (рисунки 19, 20), охватывают весь диапазон концентраций ВЭЖХ-МС анализа. Полный отчет методики для всех 7 протеотипических пептидов представлен в Приложении В.

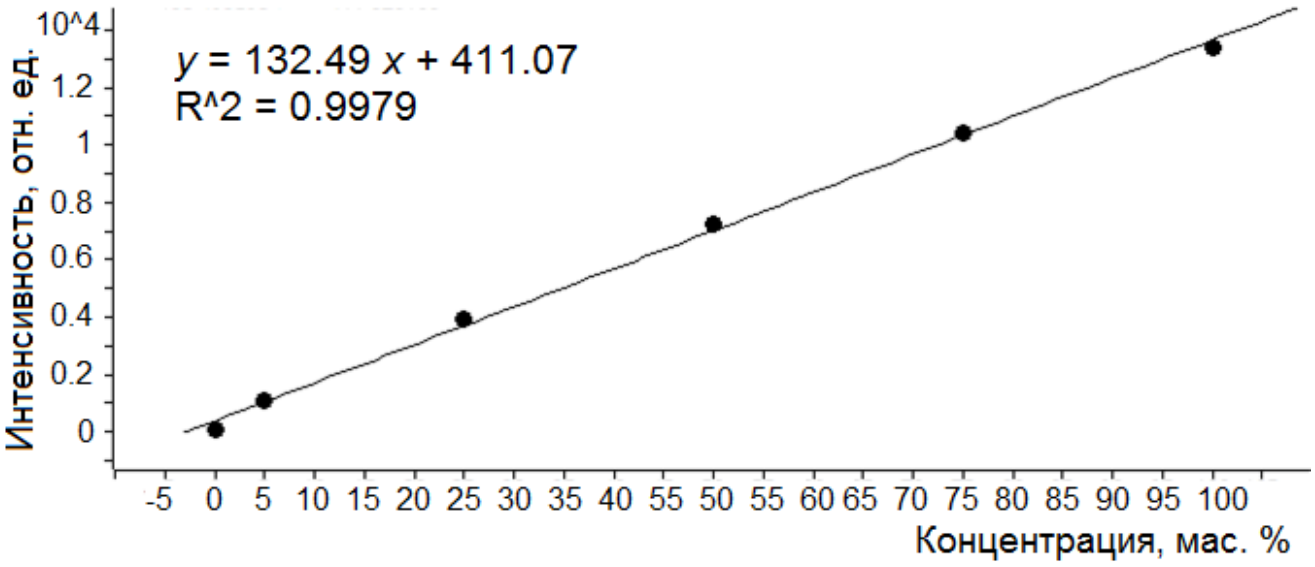


Рисунок 19 – Калибровочная кривая протеотипического пептида **SNVSDAVAQSAR** мышечной ткани говядины (белок –лактатдегидрогеназа).

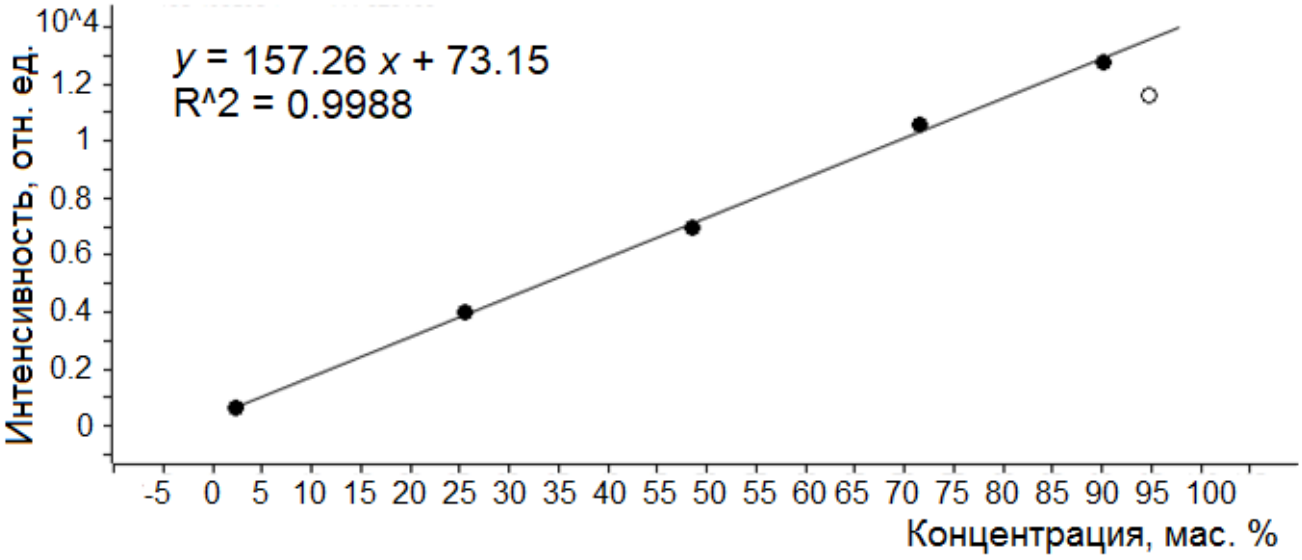


Рисунок 20 – Калибровочная кривая протеотипического пептида **YLEFISEAIIQVLQSK** мышечной ткани свинины (белок - миоглобин).

Поскольку, как было показано, увеличение аналитических вариаций в MR-анализе коррелирует с уменьшением интенсивности ионного фрагмента [136], окончательный метод представлял собой наиболее распространенный, эмпирически определенный, интерференционный переход для каждого целевого пептида. Используя разработанный метод MRM, были оценены аналитические параметры методики. Для анализа были определены критерии приемлемости, такие как линейность и аналитическая точность. Это позволило сравнить результаты

анализа MRM, что в дальнейшем может представлять практический интерес при идентификации белков в продуктах промышленного производства. Установлены метрологические характеристики метода: сходимость на модельных системах в пределах 25,0% ср. кв. отклонения (при $n = 3$). Хорошая линейность была установлена для говядины, в отличие от свинины (Таблица 8). Линейный динамический диапазон MRM для 7-ми пептидов варьировался от 5% (мас. %) мышечной ткани до 100% (мас. %) в смеси с другим видом мяса (свинина, говядина). Пределы обнаружения видов в модельных образцах находились в диапазоне 0,20–3,27% (мас. %), а пределы количественного определения – в диапазоне 0,61–9,91% (мас. %). Расчеты проводились в процентах от общего количества мяса.

Таблица 8 – Калибровочные кривые, пределы обнаружения и количественного определения для протеотипических пептидов.

Вид мяса	Пептид	Уравнение кривой	R2	LOD, % (мас. %)	LOQ, % (мас. %)
Говядина	HPSDFGADAQAAMSK	y = 4469,76 * x + 6559,33	R2=0,998	0,20	0,61
	SNVSDAVAQSAR	y = 132,49 * x + 411,07	R2=0,997	0,93	2,81
	YLEFISDAIIHVLHAK	y = 1314,94* x + 3544,25	R2=0,989	0,23	0,70
	NDMAAQYK	y = 8276,64 * x + 23568,42	R2=0,986	0,29	0,86
Свинина	HPGDFGADAQGAMSK	y =168,36 * x + 8040,57	R2=0,964	3,27	9,91
	THVSEAVAQSTR	y = 32,07 * x + 32,68	R2=0,999	1,10	3,33
	YLEFISEAIIQVLQSK	y = 157,26 * x + 73,15	R2=0,998	0,25	0,76

Степень линейности каждой стандартной кривой определялась как промежуток между определенной точкой LOQ и верхним пределом количественного определения, который был определен как проверенная точка наибольшей концентрации, которая попала в пределы точности, указанные выше. Наборы калибровочных точек от нижнего конца и/или верхнего конца кривой

последовательно удалялись из линейного регрессионного анализа, пока все точки данных, включенные в регрессионный анализ, не попали в диапазон точности 80-120%. Это обеспечило точное определение линейного диапазона концентраций каждого пептидного анализа [145, 146, 150].

Все пептиды показали высокую чувствительность LOD ниже 5,0% (мас. %) при подмесе другого вида мясного сырья. Для свинины и говядин были определены высокие значения достоверности (в диапазоне 80–120%). Важно отметить, что только один из 7-ми пептидов показал LOQ выше 3,5% (мас. %). Оба пептида говядины показали достаточно высокую чувствительность: LOQ ниже 2,9% (мас. %). Однако необходимо учитывать, что добавление низких концентраций на уровне 1-3% (мас. %) (низкий процент добавленных видов мяса), повышает процент ошибок. Для основного ингредиента в рецептуре (более высокий процент добавленного мяса) улучшается правильность. Разработанный метод обладает хорошей специфичностью и чувствительностью для исследуемых видов мяса. Его применение для количественного определения мышечной ткани с использованием калибровочной кривой в фаршах может быть улучшено для некоторых видов [145, 146, 150]. Полученные результаты представляют собой шаг вперед в области аутентификации продуктов питания.

После того, как был установлен порог обнаружения метода для каждого вида мяса, несколько образцов с неизвестным составом были подвергнуты анализу по разработанному методу для идентификации сторонних компонентов мышечной ткани другого вида животного. Учитывая, что предложенный метод ВЭЖХ / ESI-MC / MC позволяет обнаружить подмес мяса другого вида животного, отсутствие ложноотрицательных результатов демонстрирует высокую чувствительность метода. Разработанный метод показал также высокую специфичность; ложноположительные результаты не выявлены, то есть при отсутствии определенного вида мяса образцы всегда давали результаты ниже LOD.

3.4.4. Протеотипические пептиды видовой идентификации и белковых ингредиентов

В обобщенную мультиплексную методику анализа белковой фракции были добавлены ранее выбранные биомаркеры (Таблица 9).

Таблица 9 – Оптимизированные параметры MRM для выбранных биомаркеров.

Название белка	Последовательность маркерного пептида	Материнский ион (*m/z*), дочерние ионы (*m/z*)	Энергия диссоциации (CE), В
Говядина			
Миоглобин	HPSDFGADAQAAMSK	766,8 → 1395,6, 949,4, 892,4, 821,4 511,6 → 641,3, 635,3, 507,3	24,8 13,6
	NDMAAQYK	470,7 → 580,3, 509,3	15,6
	YLEFISDAIIHVLHAK	623,7 → 797,0, 732,4, 602,4	17,7
Триозофасфат-изомераза	SNVSDAVAQSAR	602,8 → 904,5, 817,4, 702,4, 532,3	19,7
Свинина			
Миоглобин	THVSEAVAQSTR	429,2 → 562,3;491,3; 625,3	10,7
	HPGDFGADAQGAMSK	496,9 → 807,4, 621,3, 493,2, 611,3	13,1
	YLEFISEAIIQVLQSK	627,7 → 815,5, 702,4, 574,4, 475,3	17,8
Курица			
Миозин-связывающий белок С	VAGAALPCAPAVK	612,8 → 855,5, 742,4, 645,3, 414,3	20,0
Молоко (коровье)			
α-s1-казеин	YLGYLEQLLR	634,4 → 991,6, 771,5, 529,3	20,7
	FFVAPFPEVFGK	692,9 → 1090,6, 676,4, 450,3	22,5

На основании полученных результатов установлена хорошая специфичность (без ложных обнаружений) и чувствительность (без ложных срабатываний). Протеомные стратегии, используемые в анализах качественных показателей мясного сырья, являются одним из перспективных средств, способствующих получению высокого класса продуктов животного происхождения (Таблица 10) [145, 146].

Таблица 10 – Показатели контроля качества разработанной мультиплексной методики для мясного сырья и готовых продуктов за один анализ.

Показатель	Биомаркер	Качественное определение	LOD, % (мас. %)	Диапазон определения, % (мас. %)	Коэф. . ст. откл.,%
М.ТК говядины	YLEFISDAIIHVLHAK (NDMAAQYK-подтверждающий) HPSDFGADAQAAMSK – фарши	да	0,2	0,6-100,0	7,4
М.ТК свинины	YLEFISEAIIQVLQSK (SALAHAVQSSR-подтверждающий)	да	0,3	0,7-100,0	5,2
М.ТК курицы	VAGAALPCAPAVK	да	-	1,0-100,0	-
Сухое молоко	FFVAPFPEVFGK	Да	-	0,3-100,0	-
	YLGYLEQLLR	Да		0,1-100,0	

Разработанный метод позволяет одновременно выявлять и количественно определять 2 различных вида животных за 25 минут в мясном сырье. Выбранные пептидные маркеры были использованы для построения калибровочных кривых с хорошей линейностью, позволяющей получить количественную оценку присутствующих видов мяса. Эта комплексная методология учитывала наиболее используемые виды в мясном секторе и в будущем способна применяться к реальным промышленным продуктам. Это имеет первостепенное значение при анализе сложных пищевых матриц как фарши, которые являются основным сырьем

для готовой продукции и наиболее подвержены фальсификации. Протеомные стратегии, используемые в анализах качественных показателей мясного сырья, являются одним из основных шагов к получению высокого класса продуктов животного происхождения [151, 152].

В рамках текущей работы предоставляем полезный инструмент как для контролирующих органов (для оценки подлинности продукции), так и для пищевой промышленности (для мониторинга поставок сырья). Более того, успех применения этого метода к сложной пищевой матрице демонстрирует, как тот же самый подход может быть успешно применен к широкому спектру пищевых продуктов.

3.5. Экономическая эффективность

Результаты расчёта экономической эффективности (в ценах 2021 года) показали, что суммарные затраты на проведение аналитических исследований «Идентификационный анализ протеотипических пептидов для мясного сырья методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием» составили 1416,64 рублей с использованием измерения общего растворимого белка и дополнительной стадией очистки и 738,25 рублей без данных стадий. Расчет стоимости произведен для одного полноценного профилирования белкового состава на данный момент для 4 показателей и имеющий потенциально расширение до 15 показателей за один анализ (Приложение Г).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В результате биоинформационного поиска было выбрано более 100 уникальных пептидов, не содержащих аминокислоты, подверженных химической модификации.

2. Проведен сравнительный анализ 58-ми аминокислотных последовательностей. Определены лучшие протеотипические пептиды для идентификации и надежного детектирования мышечной ткани основного мясного сырья и белковых ингредиентов: говядины (YLEFISDAIIHVLHAK, NDMAAQYK), свинины (YLEFISEAIIQVLQSK, SALAHAVQSSR), мяса кур (VAGAALPCAPAVK), сухого молока (FFVAPFPEVFGK, YLGYLEQLLR), обладающих термостабильностью и специфичностью.

3. Установлена селективность протеотипических пептидов на примере сравнения различных тканей свинины.

4. Разработана ВЭЖХ-МС/МС методика полуколичественной оценки мышечной ткани свинины и говядины в сложной пищевой матрице. Установлены метрологические характеристики: сходимость на модельных системах в пределах 25,0% ср. кв. отклонения (при n = 3). Предел обнаружения методики – ≥0,3% (мас. %). Предел количественного определения ≥0,9 % мас. Диапазон количественного определения от 0,9-100,0% (мас. %) с точностью в пределах 25,0% ср. кв. отклонения. Чувствительность методики позволят провести различие между случайным загрязнением ($< 1{,}0$ % (мас. %)) и сознательным внесением незаявленных ингредиентов ($> 1{,}0$ % (мас. %)).

5. Приложение по идентификации мышечной ткани включено в методические рекомендации «Методика измерений массовой доли мясного ингредиента кур в пробах мясной продукции, выработанной по национальным и межгосударственным стандартам (за исключением консервов) (№ 241.0067/RA.RU.311866/2021), методом флуоресценции для детектирования продуктов полимеразной цепной реакции в реальном времени».

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

2-DE, 2-ДЭ – двумерный гель-электрофорез

3D IT, DIT – «динамическая» ионная ловушка

AQUA™[1] – абсолютное количественное определение

CID – Диссоциация, вызванная столкновениями

DDA[2] - Анализ, зависящий от данных

EIC – хроматограмма по экстрагированному ионну

ESI – ионизация электрораспылением

ESI-MS – ионизация электрораспылением – масс-спектрометрия

ESI-MS/MS – ионизация электрораспылением – тандемная масс-спектрометрия

ETD – диссоциации с переносом электрона

FT-ICR – ловушка ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье

HCD – диссоциация с более высокой энергией

HRMS – Масс-спектрометрия нового поколения с высоким разрешением

IRMS – масс-спектрометрия с изотопным соотношением

IT – ионная ловушка

LC/LC – системы многомерной жидкостной хроматографии

LC-ESI MS/MS – жидкостная хроматография с ионизацией электрораспылением – тандемная масс-спектрометрия

LC-ESI-Orbitrap MS/MS – жидкостная хроматография – тандемный масс-спектрометр с орбитальной ионной ловушкой с ионизацией электрораспылением

LC-ESI-QqQ – жидкостная хроматография в сочетании с трехквадрупольным масс-спектрометром с электрораспылением

LC-ESI-Q-TOF MS/MS – жидкостная хроматография в сочетании с квадрупольным времяпролетным масс-спектрометром с электрораспылением

LC-MS, ВЭЖХ-МС, - жидкостная хроматография – масс-спектрометрия

---

[1] https://www.sigmaaldrich.com/RU/ru/technical-documents/technical-article/protein-biology/protein-mass-spectrometry/aqua-order

[2] https://www.technologynetworks.com/proteomics/lists/data-dependent-vs-data-independent-proteomic-analysis-331712

LC-MS/MS, ВЭЖХ-МС/МС, – жидкостная хроматография – тандемная масс-спектрометрия

LOD – предел обнаружения

LOQ – предел количественного определения

LTQ – квадрупольная линейная ловушка

m/z – соотношение массы к заряду

MALDI, МАЛДИ – Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

MALDI-MS – Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация-масс-спектрометрия

MALDI-TOF – Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация-времяпролетная масс-спектрометрия

MALDI-TOF MS – Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация-тандемная времяпролетная масс-спектрометрия

MRM - мониторинг множественных реакций

MS, МС – масс-спектр, масс-спектрометрия

MS/MS, МС/МС – тандемная масс-спектрометрия, тандемный масс-спектрометр

MS^E – масс-спектрометрия с повышенной энергией

N_2 – газ азот

nano-LC-ESI-Q-TOF MS/MS – нано-жидкостная хроматография в сочетании с квадрупольным времяпролетным масс-спектрометром с электрораспылением

nano-UPLC-ESI-Q-TOF MS^E – Нано-сверхэффективная жидкостная хроматография в сочетании с квадрупольным времяпролетным масс-спектрометром с электрораспылением при повышенной энергии

Orbitrap – орбитальная ионная ловушка

PDO[3] – защищённое наименование места происхождения

PGI – Защищённое географическое указание

PMF – «отпечатки пальцев» пептидных масс

PTM – посттрансляционные модификации

[3] https://en.wikipedia.org/wiki/Geographical_indications_and_traditional_specialities_in_the_European_Union

Qi – квадруполь

QqQ – трехквадрупольный масс-спектрометр

Q-TOF – квадрупольный времяпролетный масс-спектрометр

SD – среднеквадратичное отклонение

SIM – мониторинг выбранного иона

SMIM – выбранный мониторинг ионов, полученных в результате тандемной масс-спектрометрии

SRM – мониторинг выбранных реакций

TOF – времяпролетный масс-анализатор

Triton X-100 – неионное поверхностно активное вещество.

TSG - Гарантия традиционности

UPLC – системами жидкостной хроматографии сверхвысокой производительности

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

ГХ – газовая хроматография

ГХ-МС – газовая хроматография – масс-спектрометрия

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота.

ИФА, ELISA – иммуноферментный анализ

ИХА – иммунохроматогрический анализ

КРС – крупный рогатый скот

М. ТК – мышечная ткань

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ТИ – Техническая инструкция

ТР ТС – Технический регламент Таможенного союза

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ruiz Orduna, A. Detection of meat species adulteration using high-resolution mass spectrometry and a proteogenomics strategy / A. Ruiz Orduna, E. Husby, C.T. Yang, D. Ghosh, F. Beaudry // Food Additives & Contaminants: Part A. – 2017. – Vol. 34, № 7. – P. 1110-1120. https://doi.org/ 10.1080/19440049.2017.1329951

2. Mikołajczak, B. LC–Q–TOF–MS/MS Identification of Specific Non-Meat Proteins and Peptides in Beef Burgers / B. Mikołajczak, E. Fornal, M. Montowska // Molecules. – 2019. – Vol. 24, № 1. – P. 18. https:// doi.org/10.3390/molecules24010018

3. Pilolli, R. Critical review on proteotypic peptide marker tracing for six allergenic ingredients in incurred foods by mass spectrometry / R. Pilolli, C. Nitride, N. Gillard, A.-C. Huet, C. van Poucke, M. de Loose, O. Tranquet, C. Larre, K. Adel-Patient, H. Bernard // Food Research International. – 2020. – Vol. 128. – P. 108747. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108747

4. Montowska, M. Quantification of species-specific meat proteins in cooked and smoked sausages using infusion mass spectrometry / M. Montowska, A. Spychaj // Journal of Food Science and Technology. – 2018. – Vol. 55, № 12. – P. 4984-4993. https://doi.org/10.1007/s13197-018- 3437-y

5. Naaum, A.M. Complementary molecular methods detect undeclared species in sausage products at retail markets in Canada / A.M. Naaum, H.R. Shehata, S. Chen, J. Li, N. Tabujara, D. Awmack, C. Lutze-Wallace, R. Hanner // Food Control. – 2018. – Vol. 84. – P. 339-344. https://doi.org/ 10.1016/j.foodcont.2017.07.040

6. Sarah, S. LC–QTOF-MS identification of porcine-specific peptide in heat treated pork identifies candidate markers for meat species determination / S. Sarah, W. Faradalila, M. Salwani, I. Amin, S. Karsani, A. Sazili // Food Chemistry. – 2016. – Vol. 199. – P. 157-164. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.121

7. Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food saf. Official Journal of the European Communities, L–31, 1–24.

8. Fornal, E. Species-specific peptide-based liquid chromatography–mass spectrometry monitoring of three poultry species in processed meat products / E. Fornal, M. Montowska // Food Chemistry. – 2019. – Vol. 283. – P. 489-498. https://doi.org/10.1016/j. foodchem.2019.01.074

9. Gavage, M. Selection of egg peptide biomarkers in processed food products by high resolution mass spectrometry / M. Gavage, K. Van Vlierberghe, C. Van Poucke, M. De Loose, K. Gevaert, M. Dieu, P. Renard, T. Arnould, N. Gillard // Journal of Chromatography A. – 2019. – Vol. 1584. – P. 115-125. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.11.036

10. Gavage, M. High-resolution mass spectrometry-based selection of peanut peptide biomarkers considering food processing and market type variation / M. Gavage, K. Van Vlierberghe, C. Van Poucke, M. De Loose, K. Gevaert, M. Dieu, P. Renard, T. Arnould, N. Gillard // Food chemistry. – 2020. – Vol. 304. – P. 125428. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125428

11. Jira, W. A sensitive HPLC-MS/MS screening method for the simultaneous detection of barley, maize, oats, rice, rye and wheat proteins in meat products / W. Jira, S. Münch // Food Chemistry. – 2019. – Vol. 275. – P. 214-223. https://doi.org/10.1016/j. foodchem.2018.09.041

12. Li, Y. Simultaneous determination of heat stable peptides for eight animal and plant species in meat products using UPLC-MS/MS method / Y. Li, Y. Zhang, H. Li, W. Zhao, W. Guo, S. Wang // Food Chemistry. – 2018. – Vol. 245. – P. 125-131. https://doi. org/10.1016/j.foodchem.2017.09.066

13. Ma, X. Comprehensive quantification of sesame allergens in processed food using liquid chromatography-tandem mass spectrometry / X. Ma, H. Li, J. Zhang, W. Huang, J. Han, Y. Ge, J. Sun, Y. Chen // Food Control. – 2020. – Vol. 107. – P. 106744. https://doi.org/ 10.1016/j.foodcont.2019.106744

14. Montowska, M. Label-free quantification of meat proteins for evaluation of species composition of processed meat products / M. Montowska, E. Fornal // Food chemistry. – 2017. – Vol. 237. – P. 1092-1100. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.059

15. Montowska, M. Nutritional value, protein and peptide composition of edible cricket powders / M. Montowska, P.Ł. Kowalczewski, I. Rybicka, E. Fornal // Food chemistry. – 2019. – Vol. 289. – P. 130-138. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.062

16. Naveena, B.M. OFFGEL electrophoresis and tandem mass spectrometry approach compared with DNA-based PCR method for authentication of meat species from raw and cooked ground meat mixtures containing cattle meat, water buffalo meat and sheep meat / B.M. Naveena, D.S. Jagadeesh, A.J. Babu, T.M. Rao, V. Kamuni, S. Vaithiyanathan, V.V. Kulkarni, S. Rapole // Food Chemistry. – 2017. – Vol. 233. – P. 311-320. https://doi.org/ 10.1016/j.foodchem.2017.04.116

17. Pan, X.D. Authentication of pork in meat mixtures using PRM mass spectrometry of myosin peptides / X.-D. Pan, J. Chen, Q. Chen, B.-F. Huang, J.-L. Han // RSC advances. – 2018. – Vol. 8, № 20. – P. 11157-11162. .https://doi.org/10.1039/c8ra00926k

18. Prandi, B. Species specific marker peptides for meat authenticity assessment: A multispecies quantitative approach applied to Bolognese sauce / B. Prandi, M. Varani, A. Faccini, F. Lambertini, M. Suman, A. Leporati, T. Tedeschi, S. Sforza // Food Control. – 2019. – Vol. 97. – P. 15-24. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.10.016

19. Stachniuk, A. LC-QTOF-MS identification of rabbit-specific peptides for authenticating the species composition of meat products / A. Stachniuk, A. Sumara, M. Montowska, E. Fornal // Food Chemistry. – 2020. – Vol. 329. – P. 127185. https://doi.org/10.1016/j. foodchem.2020.127185

20. Wang, G.-J. Peptide biomarkers identified by LC–MS in processed meats of five animal species / G.-J. Wang, G.-Y. Zhou, H.-W. Ren, Y. Xu, Y. Yang, L.-H. Guo, N. Liu // Journal of Food Composition and Analysis. – 2018. – Vol. 73. – P. 47-54. https://doi.org/10.1016/j. jfca.2018.07.004

21. von Bargen, C. Meat authentication: A new HPLC–MS/MS based method for the fast and sensitive detection of horse and pork in highly processed food / C. von

Bargen, J. Brockmeyer, H.-U. Humpf // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2014. – Vol. 62, № 39. – P. 9428-9435. https://doi.org/10.1021/jf503468t

22. Carrera, M. Rapid direct detection of the major fish allergen, parvalbumin, by selected MS/MS ion monitoring mass spectrometry / M. Carrera, B. Cañas, J.M. Gallardo // Journal of proteomics. – 2012. – Vol. 75, № 11. – P. 3211-3220. https://doi.org/10.1016/j. jprot.2012.03.030

23. Sun, L. Development of a method for the quantification of fish major allergen parvalbumin in food matrix via liquid chromatography-tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring / L. Sun, H. Lin, Z. Li, W. Sun, J. Wang, H. Wu, M. Ge, I. Ahmed, T.R. Pavase // Food chemistry. – 2019. – Vol. 276. – P. 358-365. https://doi.org/10.1016/j. foodchem.2018.10.014

24. Hu, L. Identification of peptide biomarkers for discrimination of shrimp species through SWATH-MS-based proteomics and chemometrics / L. Hu, H. Zhang, X. Zhang, T. Zhang, Y. Chang, X. Zhao, J. Xu, Y. Xue, Z. Li, Y. Wang // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2018. – Vol. 66, № 40. – P. 10567-10574. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04375

25. Guglielmetti, C. Two-dimensional gel and shotgun proteomics approaches to distinguish fresh and frozen-thawed curled octopus (Eledone cirrhosa) / C. Guglielmetti, M. Manfredi, S. Brusadore, S. Sciuto, G. Esposito, P.G. Ubaldi, L. Magnani, S. Gili, E. Marengo, P.L. Acutis // Journal of proteomics. – 2018. – Vol. 186. – P. 1-7. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.07.017

26. Montowska, M. Absolute quantification of targeted meat and allergenic protein additive peptide markers in meat products / M. Montowska, E. Fornal // Food chemistry. – 2019. – Vol. 274. – P. 857-864. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.131

27. Qi, K. A rapid immobilized trypsin digestion combined with liquid chromatography–Tandem mass spectrometry for the detection of milk allergens in baked food / K. Qi, T. Liu, Y. Yang, J. Zhang, J. Yin, X. Ding, W. Qin, Y. Yang // Food Control. – 2019. – Vol. 102. – P. 179-187. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.03.017

28. Montowska, M. Detection of peptide markers of soy, milk and egg white allergenic proteins in poultry products by LC-Q-TOF-MS/MS / M. Montowska, E. Fornal // LWT. – 2018. – Vol. 87. – P. 310-317. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.091

29. Ruhland, M. Food fraud: A simple and efficient LC–MS/MS approach for peptide-based food authentication // Book Food fraud: A simple and efficient LC–MS/MS approach for peptide-based food authentication / EditorOxford University Press, 2019. https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0058

30. Van Vlierberghe, K. Selection of universal peptide biomarkers for the detection of the allergen hazelnut in food trough a comprehensive, high resolution mass spectrometric (HRMS) based approach / K. Van Vlierberghe, M. Gavage, M. Dieu, P. Renard, T. Arnould, N. Gillard, K. Coudijzer, M. De Loose, K. Gevaert, C. Van Poucke // Food chemistry. – 2020. – Vol. 309. – P. 125679.

31. Hoffmann, B. A sensitive HPLC-MS/MS screening method for the simultaneous detection of lupine, pea, and soy proteins in meat products / B. Hoffmann, S. Münch, F. Schwägele, C. Neusüß, W. Jira // Food Control. – 2017. – Vol. 71. – P. 200-209. https://doi.org/10.1016/j. foodcont.2016.06.021

32. Stachniuk, A. Liquid chromatography–mass spectrometry bottom-up proteomic methods in animal species analysis of processed meat for food authentication and the detection of adulterations / A. Stachniuk, A. Sumara, M. Montowska, E. Fornal // Mass spectrometry reviews. – 2021. – Vol. 40, № 1. – P. 3-30. https://doi.org/10.1002/mas.21605

33. Claydon, A.J. Identification of novel peptides for horse meat speciation in highly processed foodstuffs / A.J. Claydon, H.H. Grundy, A.J. Charlton, M.R. Romero // Food Additives & Contaminants: Part A. – 2015. – Vol. 32, № 10. – P. 1718-1729. https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1075256

34. Sentandreu, M.A. A proteomic-based approach for detection of chicken in meat mixes / M.A. Sentandreu, P.D. Fraser, J. Halket, R. Patel, P.M. Bramley // Journal of Proteome Research. – 2010. – Vol. 9, № 7. – P. 3374-3383. https://doi.org/10.1021/pr9008942.

35. Nalazek-Rudnicka, K. MRM–MS of marker peptides and their abundance as a tool for authentication of meat species and meat cuts in single-cut meat products / K. Nalazek-Rudnicka, I. Kłosowska-Chomiczewska, A. Wasik, A. Macierzanka // Food chemistry. – 2019. – Vol. 283. – P. 367-374.https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.007.

36. Bilek, A.E. Enhancement of the nutritional status of beef patties by adding flaxseed flour / A.E. Bilek, S. Turhan // Meat science. – 2009. – Vol. 82, № 4. – P. 472-477.

37. Frassinetti, S. Nutraceutical potential of hemp (Cannabis sativa L.) seeds and sprouts / S. Frassinetti, E. Moccia, L. Caltavuturo, M. Gabriele, V. Longo, L. Bellani, G. Giorgi, L. Giorgetti // Food chemistry. – 2018. – Vol. 262. – P. 56-66.

38. Kotecka-Majchrzak, K. Oilseed proteins–Properties and application as a food ingredient / K. Kotecka-Majchrzak, A. Sumara, E. Fornal, M. Montowska // Trends in Food Science & Technology. – 2020.

39. Novello, D. The effect of golden flaxseed and by-product addition in beef patties: physicochemical properties and sensory acceptance / D. Novello, D. Schiessel, E. Santos, M. Pollonio // International food research journal. – 2019. – Vol. 26, № 4. – P. 1237-1248.

40. Zając, M. The quality of pork loaves with the addition of hemp seeds, de-hulled hemp seeds, hemp protein and hemp flour / M. Zając, P. Guzik, P. Kulawik, J. Tkaczewska, A. Florkiewicz, W. Migdał // LWT. – 2019. – Vol. 105. – P. 190-199.

41. Kumar, P. Meat analogues: Health promising sustainable meat substitutes / P. Kumar, M. Chatli, N. Mehta, P. Singh, O. Malav, A.K. Verma // Critical reviews in food science and nutrition. – 2017. – Vol. 57, № 5. – P. 923-932.

42. Stephan, A. Edible mushroom mycelia of Pleurotus sapidus as novel protein sources in a vegan boiled sausage analog system: functionality and sensory tests in comparison to commercial proteins and meat sausages / A. Stephan, J. Ahlborn, M. Zajul, H. Zorn // European Food Research and Technology. – 2018. – Vol. 244, № 5. – P. 913-924.

43. Lam, A. Pea protein isolates: Structure, extraction, and functionality / A. Lam, A. Can Karaca, R. Tyler, M. Nickerson // Food Reviews International. – 2018. – Vol. 34, № 2. – P. 126-147.

44. Aung, M.M. Traceability in a food supply chain: Safety and quality perspectives / M.M. Aung, Y.S. Chang // Food control. – 2014. – Vol. 39. – P. 172-184.

45. Manning, L. Food fraud: Policy and food chain / L. Manning // Current Opinion in Food Science. – 2016. – Vol. 10. – P. 16-21.

46. Ehmke, M.D. Food fraud: Economic insights into the dark side of incentives / M.D. Ehmke, A. Bonanno, K. Boys, T.G. Smith // Australian Journal of Agricultural and Resource Economics. – 2019. – Vol. 63, № 4. – P. 685-700.

47. Esteki, M. Tackling fraudsters with global strategies to expose fraud in the food chain / M. Esteki, J. Regueiro, J. Simal-Gándara // Comprehensive reviews in food science and food safety. – 2019. – Vol. 18, № 2. – P. 425-440.

48. Medina, S. Current trends and recent advances on food authenticity technologies and chemometric approaches / S. Medina, R. Perestrelo, P. Silva, J.A. Pereira, J.S. Câmara // Trends in Food Science & Technology. – 2019. – Vol. 85. – P. 163-176.

49. Tibola, C.S. Economically motivated food fraud and adulteration in Brazil: Incidents and alternatives to minimize occurrence / C.S. Tibola, S.A. da Silva, A.A. Dossa, D.I. Patrício // Journal of food science. – 2018. – Vol. 83, № 8. – P. 2028-2038.

50. Illicit Food and Drink Seized in Global Operation. [электронный ресурс]. – 2021. – Дата обращения: 21.06.2021. URL:https://www.interpol.int/News-and-Events/News/2019/Illicit-food-and-drinkseized-in-global-operation

51. Brockmeyer, J. Novel approaches for the MS-based detection of food allergens: High resolution, MS3, and beyond / J. Brockmeyer // Journal of AOAC International. – 2018. – Vol. 101, № 1. – P. 124-131.

52. Stoyke, M. German Government Official Methods Board Points the Way Forward: Launch of a New Working Group for Mass Spectrometry for Protein Analysis to Detect Food Fraud and Food Allergens. M. Stoyke, R. Becker, J. Brockmeyer, W. Jira,

B. Popping, S. Uhlig, S. Wittke // J AOAC Int. – 2019. – Vol. 102, № 5. – P. 1280-1285. https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0056

53. Creydt, M. Omics approaches for food authentication / M. Creydt, M. Fischer // Electrophoresis. – 2018. – Vol. 39, № 13. – P. 1569-1581.

54. He, Y. Detection of adulteration in food based on nondestructive analysis techniques: A review / Y. He, X. Bai, Q. Xiao, F. Liu, L. Zhou, C. Zhang // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2021. – Vol. 61, № 14. – P. 2351-2371.

55. Li, Y.C. Comparative review and the recent progress in detection technologies of meat product adulteration / Y.C. Li, S.Y. Liu, F.B. Meng, D.Y. Liu, Y. Zhang, W. Wang, J.M. Zhang // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. – 2020. – Vol. 19, № 4. – P. 2256-2296.

56. Sajali, N. Analytical approaches of meat authentication in food / N. Sajali, S.C. Wong, S. Abu Bakar, N.F. Khairil Mokhtar, Y.N. Manaf, M.H. Yuswan, M.N. Mohd Desa // International Journal of Food Science & Technology. – 2021. – Vol. 56, № 4. – P. 1535-1543.

57. Valand, R. A review of Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy used in food adulteration and authenticity investigations / R. Valand, S. Tanna, G. Lawson, L. Bengtström // Food Additives & Contaminants: Part A. – 2020. – Vol. 37, № 1. – P. 19-38.

58. Zhang, Y. Identification and absolute quantification of animal blood products by peptide markers using an UPLC–MS/MS method / Y. Zhang, S. Wang, Y. Ma, H. Li, Y. Li // European Food Research and Technology. – 2020. – Vol. 246, № 3. – P. 581-589.

59. Häfner, L. Authentication of nine poultry species using high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry / L. Häfner, S. Kalkhof, W. Jira // Food Control. – 2021. – Vol. 122. – P. 107803.

60. Croote, D. Addressing complex matrix interference improves multiplex food allergen detection by targeted LC–MS/MS / D. Croote, I. Braslavsky, S.R. Quake // Analytical chemistry. – 2019. – Vol. 91, № 15. – P. 9760-9769.

61. Stella, R. LC-HRMS/MS for the simultaneous determination of four allergens in fish and swine food products / R. Stella, G. Sette, A. Moressa, A. Gallina, A.M. Aloisi, R. Angeletti, G. Biancotto // Food Chemistry. – 2020. – Vol. 331. – P. 127276.

62. Волков, В. Выдающиеся химики мира / В. Волков, Е. Вонский, Г. Кузнецова //. – Москва. – 1991.

63. Александров, М. Новый масс-спектрометрический метод определения аминокислотной последовательности пептидов / М. Александров, Г. Барам, Л. Галль, М. Грачев, В. Кнорре, Н. Краснов, Ю. Куснер, О. Миргородская, В. Николаев, В. Шкуров // Биоорганическая химия. – 1985. – Т. 11, № 5. – С. 705-708.

64. Berzelius, L.H. Dictionary of Scientific Biography 2 / L.H. Berzelius, J. Jacob, H. Leicester // New York: Charles Scribner's Sons. – 1980. – P. 90-97.

65. Данилевский, А. Биолого-химические сообщения о белковых веществах / А. Данилевский // Физиологический сборник. – 1888. – Т. 1. – С. 289.

66. Порохов М.А. Белки. Химическая энциклопедия [Книга]. - Москва : Советская энциклопедия, 1988. – 625 с.

67. Биография Эмиль Фишер [электронный ресурс]. – 2021. – Дата обращения: 21.06.2021. URL: https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1902/fischer/biographical/

68. Биография Джеймс Б. Самнер [электронный ресурс]. – 2021. – Дата обращения: 21.06.2021. URL: https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1946/sumner/biographical/

69. Биография Фредерик Сэнгер [электронный ресурс]. – 2021. – Дата обращения: 21.06.2021. URL: https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1958/sanger/facts/

70. Bernal, J.D. William Thomas Astbury, 1898-1961 // Book William Thomas Astbury, 1898-1961 / EditorThe Royal Society London, 1963.

71. Pauling, L. The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain / L. Pauling, R.B. Corey, H.R. Branson // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1951. – Vol. 37, № 4. – P. 205-211.

72. Биография Джон К. Кендрю [электронный ресурс]. – 2021. – Дата обращения: 21.06.2021. URL: https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1962/kendrew/facts/

73. Биография Макс Ф. Перуц [электронный ресурс]. – 2021. – Дата обращения: 21.06.2021. URL: https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1962/perutz/facts/

74. Единое хранилище информации о трехмерных структурах белков, нуклеиновых кислот и сложных ансамблях [электронный ресурс]. – 2021. – Дата обращения: 21.06.2021. URL: https://www.wwpdb.org/

75. Методы изучения белков [электронный ресурс]. – 2021. – Дата обращения: 21.06.2021. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Protein_methods

76. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // Analytical biochemistry. – 1976. – Vol. 72, № 1-2. – P. 248-254.

77. Bauer, T. The effect of processing parameters on DNA degradation in food / T. Bauer, P. Weller, W.P. Hammes, C. Hertel // European Food Research and Technology. – 2003. – Vol. 217, № 4. – P. 338-343.

78. Terry, C.F. Detection of genetically modified crops and their derivatives: critical steps in sample preparation and extraction / C.F. Terry, N. Harris, H.C. Parkes // Journal of AOAC International. – 2002. – Vol. 85, № 3. – P. 768-774.

79. Sentandreu, M.Á. Authenticity of meat products: Tools against fraud / M.Á. Sentandreu, E. Sentandreu // Food Research International. – 2014. – Vol. 60. – P. 19-29.

80. Rahmati, S. Identification of meat origin in food products–A review / S. Rahmati, N.M. Julkapli, W.A. Yehye, W.J. Basirun // Food Control. – 2016. – Vol. 68. – P. 379-390.

81. Hellberg, R.S. Identification of meat and poultry species in food products using DNA barcoding / R.S. Hellberg, B.C. Hernandez, E.L. Hernandez // Food Control. – 2017. – Vol. 80. – P. 23-28.

82. Torelli, E. Chemiluminescent optical fibre genosensor for porcine meat detection / E. Torelli, M. Manzano, R.S. Marks // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2017. – Vol. 247. – P. 868-874.

83. Asensio, L. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) / L. Asensio, I. González, T. García, R. Martín // Food control. – 2008. – Vol. 19, № 1. – P. 1-8.

84. Berger, R.G. Detection of poultry and pork in cooked and canned meat foods by enzyme-linked immunosorbent assays / R.G. Berger, R.P. Mageau, B. Schwab, R.W. Johnston // Journal of the association of Official analytical Chemists. – 1988. – Vol. 71, № 2. – P. 406-409.

85. Martin, D.R. Quantitative evaluation of pork adulteration in raw ground beef by radial immunodiffusion and enzyme-linked immunosorbent assay / D.R. Martin, J. Chan, J.Y. Chiu // Journal of food protection. – 1998. – Vol. 61, № 12. – P. 1686-1690.

86. Renčová, E. Identification by ELISA of poultry, horse, kangaroo, and rat muscle specific proteins in heat-processed products / E. Renčová, I. Svoboda, L. Necidova // Veterinarni Medicina. – 2000. – Vol. 45, № 12. – P. 353-356.

87. Vlachos, A. An updated review of meat authenticity methods and applications / A. Vlachos, I.S. Arvanitoyannis, P. Tserkezou // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2016. – Vol. 56, № 7. – P. 1061-1096.

88. Ayaz, Y. Detection of species in meat and meat products using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay / Y. Ayaz, N. Ayaz, I. Erol // Journal of Muscle Foods. – 2006. – Vol. 17, № 2. – P. 214-220.

89. Macedo-Silva, A. Hamburger meat identification by dot-ELISA / A. Macedo-Silva, S. Barbosa, M. Alkmin, A. Vaz, M. Shimokomaki, A. Tenuta-Filho // Meat Science. – 2000. – Vol. 56, № 2. – P. 189-192.

90. Chen, F.C. Detection of pork in heat-processed meat products by monoclonal antibody-based ELISA / F.-C. Chen, Y.P. Hsieh // Journal of AOAC International. – 2000. – Vol. 83, № 1. – P. 79-85.

91. Rahman, M.M. Lab-on-a-chip PCR-RFLP assay for the detection of canine DNA in burger formulations / M.M. Rahman, M.E. Ali, S.B. Abd Hamid, S. Bhassu, S.

Mustafa, M. Al Amin, M.A. Razzak // Food Analytical Methods. – 2015. – Vol. 8, № 6. – P. 1598-1606.

92. Kotoura, S. Establishment of a sandwich ELISA for the determination of beef content in processed foods by using monoclonal antibodies to myoglobin / S. Kotoura, Y. Murakami-Yamaguchi, K. Kizu, M. Nakamura, H. Fuchu, K. Miake, M. Sugiyama, H. Narita // Food and agricultural immunology. – 2012. – Vol. 23, № 3. – P. 289-301.

93. Zvereva, E.A. Enzyme immunoassay and proteomic characterization of troponin I as a marker of mammalian muscle compounds in raw meat and some meat products / E.A. Zvereva, L.I. Kovalev, A.V. Ivanov, M.A. Kovaleva, A.V. Zherdev, S.S. Shishkin, A.B. Lisitsyn, I.M. Chernukha, B.B. Dzantiev // Meat science. – 2015. – Vol. 105. – P. 46-52.

94. Masiri, J. Development and validation of a rapid test system for detection of pork meat and collagen residues / J. Masiri, L. Benoit, B. Barrios-Lopez, C. Thienes, M. Meshgi, A. Agapov, A. Dobritsa, C. Nadala, M. Samadpour // Meat Science. – 2016. – Vol. 121. – P. 397-402.

95. Rao, Q. Evaluation of a commercial lateral flow feed test for rapid detection of beef and sheep content in raw and cooked meats / Q. Rao, Y.-H.P. Hsieh // Meat Science. – 2007. – Vol. 76, № 3. – P. 489-494.

96. Bonwick, G.A. Immunoassays: their history, development and current place in food science and technology / G.A. Bonwick, C.J. Smith // International journal of food science & technology. – 2004. – Vol. 39, № 8. – P. 817-827.

97. González-Córdova, A. Deteccion inmunoquimica de la adulteracion de chorizo de cerdo con proteinas de soja: Immunochemical detection of fraudulent adulteration of pork chorizo (sausage) with soy protein / A. González-Córdova, A. Calderón de la Barca, M. Cota, B. Vallejo-Cordoba // Food science and technology international. – 1998. – Vol. 4, № 4. – P. 257-262.

98. Koppelman, S.J. Detection of soy proteins in processed foods: literature overview and new experimental work / S.J. Koppelman, C.M. Lakemond, R. Vlooswijk, S.L. Hefle // Journal of AOAC International. – 2004. – Vol. 87, № 6. – P. 1398-1407.

99. Morisset, M. Anaphylaxis to pork kidney is related to I g E antibodies specific for galactose-alpha-1, 3-galactose / M. Morisset, C. Richard, C. Astier, S. Jacquenet, A. Croizier, E. Beaudouin, V. Cordebar, F. Morel-Codreanu, N. Petit, D. Moneret-Vautrin // Allergy. – 2012. – Vol. 67, № 5. – P. 699-704.

100. Yin, R. A validated strip-based lateral flow assay for the confirmation of sheep-specific PCR products for the authentication of meat / R. Yin, Y. Sun, S. Yu, Y. Wang, M. Zhang, Y. Xu, J. Xue, N. Xu // Food Control. – 2016. – Vol. 60. – P. 146-150.

101. Feng, T. Cross priming amplification with nucleic acid test strip analysis of mutton in meat mixtures / T. Feng, S. Li, S. Wang, J. Pan // Food chemistry. – 2018. – Vol. 245. – P. 641-645.

102. Fanali, C. Advances in chromatographic techniques for food authenticity testing // Advances in food authenticity testingElsevier, 2016. – P. 253-284.

103. Di Giuseppe, A.M. An improved UPLC method for the detection of undeclared horse meat addition by using myoglobin as molecular marker / A.M. Di Giuseppe, N. Giarretta, M. Lippert, V. Severino, A. Di Maro // Food chemistry. – 2015. – Vol. 169. – P. 241-245.

104. Herrero, M. Multidimensional chromatography in food analysis / M. Herrero, E. Ibanez, A. Cifuentes, J. Bernal // Journal of Chromatography A. – 2009. – Vol. 1216, № 43. – P. 7110-7129.

105. Cacciola, F. Advances in LC-MS for food analysis / F. Cacciola, P. Donato, M. Beccaria, P. Dugo, L. Mondello // Lc Gc Europe. – 2012. – Vol. 25, № 5. – P. 15.

106. Tranchida, P.Q. Advances in GC–MS for Food Analysis / P.Q. Tranchida, P. Dugo, L. Mondello //. – 2012.

107. Santos, J. Chromatography: Introduction to chromatography–Techniques / J. Santos, M.B.P. Oliveira // Food Authentication: Management, Analysis and Regulation. – 2017. – P. 199-232.

108. Herrero, M. Foodomics: MS-based strategies in modern food science and nutrition / M. Herrero, C. Simó, V. García-Cañas, E. Ibáñez, A. Cifuentes // Mass spectrometry reviews. – 2012. – Vol. 31, № 1. – P. 49-69.

109. Wang, X. The latest developments and applications of mass spectrometry in food-safety and quality analysis / X. Wang, S. Wang, Z. Cai // TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2013. – Vol. 52. – P. 170-185.

110. Picó, Y. Mass spectrometry in food quality and safety: an overview of the current status / Y. Picó // Comprehensive Analytical Chemistry. – 2015. – Vol. 68. – P. 3-76.

111. Makarov, A. Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry / A. Makarov, M. Scigelova // Journal of Chromatography A. – 2010. – Vol. 1217, № 25. – P. 3938-3945.

112. Zubarev, R.A. Orbitrap mass spectrometry // Book Orbitrap mass spectrometry / EditorACS Publications, 2013.

113. Karoui, R. Mid-infrared spectroscopy coupled with chemometrics: a tool for the analysis of intact food systems and the exploration of their molecular structure–quality relationships– a review / R. Karoui, G. Downey, C. Blecker // Chemical reviews. – 2010. – Vol. 110, № 10. – P. 6144-6168.

114. Prieto, N. A review of the principles and applications of near-infrared spectroscopy to characterize meat, fat, and meat products / N. Prieto, O. Pawluczyk, M.E.R. Dugan, J.L. Aalhus // Applied spectroscopy. – 2017. – Vol. 71, № 7. – P. 1403-1426.

115. Cozzolino, D. A review on the application of infrared technologies to determine and monitor composition and other quality characteristics in raw fish, fish products, and seafood / D. Cozzolino, I. Murray // Applied Spectroscopy Reviews. – 2012. – Vol. 47, № 3. – P. 207-218.

116. Cozzolino, D. Quality control of honey using infrared spectroscopy: a review / D. Cozzolino, E. Corbella, H. Smyth // Applied Spectroscopy Reviews. – 2011. – Vol. 46, № 7. – P. 523-538.

117. Basalekou, M. Wine authentication with Fourier Transform Infrared Spectroscopy: a feasibility study on variety, type of barrel wood and ageing time classification / M. Basalekou, C. Pappas, P. Tarantilis, Y. Kotseridis, S. Kallithraka //

International Journal of Food Science & Technology. – 2017. – Vol. 52, № 6. – P. 1307-1313.

118. Caporaso, N. Near-Infrared spectroscopy and hyperspectral imaging for non-destructive quality assessment of cereal grains / N. Caporaso, M.B. Whitworth, I.D. Fisk // Applied spectroscopy reviews. – 2018. – Vol. 53, № 8. – P. 667-687.

119. Karoui, R. Fluorescence spectroscopy measurement for quality assessment of food systems—a review / R. Karoui, C. Blecker // Food and Bioprocess technology. – 2011. – Vol. 4, № 3. – P. 364-386.

120. Agapito-Tenfen, S.Z. Comparative proteomic analysis of genetically modified maize grown under different agroecosystems conditions in Brazil / S.Z. Agapito-Tenfen, M.P. Guerra, O.-G. Wikmark, R.O. Nodari // Proteome science. – 2013. – Vol. 11, № 1. – P. 1-15. https://doi.org/ 10.1186/1477-5956-11-46.

121. Consonni, R. The potentiality of NMR-based metabolomics in food science and food authentication assessment / R. Consonni, L.R. Cagliani // Magnetic Resonance in Chemistry. – 2019. – Vol. 57, № 9. – P. 558-578.

122. Camin, F. Stable isotope ratio analysis for assessing the authenticity of food of animal origin / F. Camin, L. Bontempo, M. Perini, E. Piasentier // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. – 2016. – Vol. 15, № 5. – P. 868-877.

123. Katerinopoulou, K. Geographical origin authentication of agri-food products: A review / K. Katerinopoulou, A. Kontogeorgos, C.E. Salmas, A. Patakas, A. Ladavos // Foods. – 2020. – Vol. 9, № 4. – P. 489.

124. Panchaud, A. Experimental and computational approaches to quantitative proteomics: status quo and outlook / A. Panchaud, M. Affolter, P. Moreillon, M. Kussmann // Journal of proteomics. – 2008. – Vol. 71, № 1. – P. 19-33.

125. Martínez-Maqueda, D. Gómez-Ruiz. Extraction/fractionation techniques for proteins and peptides and protein digestion // Proteomics in foodsSpringer, 2013. – P. 21-50.

126. Ortea, I. Selected tandem mass spectrometry ion monitoring for the fast identification of seafood species / I. Ortea, B. Cañas, J.M. Gallardo // Journal of Chromatography A. – 2011. – Vol. 1218, № 28. – P. 4445-4451.

127. Mamone, G. Analysis of food proteins and peptides by mass spectrometry-based techniques / G. Mamone, G. Picariello, S. Caira, F. Addeo, P. Ferranti // Journal of Chromatography A. – 2009. – Vol. 1216, № 43. – P. 7130-7142.

128. Mamone, G. The role of proteomics in the discovery of marker proteins of food adulteration // Proteomics in FoodsSpringer, 2013. – P. 465-501.

129. Samperi, R. Food proteins and peptides // Comprehensive Analytical ChemistryElsevier, 2015. – P. 309-357.

130. Taylor, A.J. Potential of electrospray mass spectrometry for meat pigment identification / A.J. Taylor, R. Linforth, O. Weir, T. Hutton, B. Green // Meat science. – 1993. – Vol. 33, № 1. – P. 75-83.

131. Ponce-Alquicira, E. Extraction and ESI–CID–MS/MS analysis of myoglobins from different meat species / E. Ponce-Alquicira, A. Taylor // Food chemistry. – 2000. – Vol. 69, № 1. – P. 81-86.

132. Montowska, M. Myosin light chain isoforms retain their species-specific electrophoretic mobility after processing, which enables differentiation between six species: 2DE analysis of minced meat and meat products made from beef, pork and poultry / M. Montowska, E. Pospiech // Proteomics. – 2012. – Vol. 12, № 18. – P. 2879-2889.

133. Montowska, M. Species-specific expression of various proteins in meat tissue: proteomic analysis of raw and cooked meat and meat products made from beef, pork and selected poultry species / M. Montowska, E. Pospiech // Food chemistry. – 2013. – Vol. 136, № 3-4. – P. 1461-1469.

134. Naveena, B.M. Rapole. In-gel and OFFGEL-based proteomic approach for authentication of meat species from minced meat and meat products / B.M. Naveena, D.S. Jagadeesh, V. Kamuni, M. Muthukumar, V.V. Kulkarni, M. Kiran, S. Rapole // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2018. – Vol. 98, № 3. – P. 1188-1196.

135. Ruiz Orduna, A. Assessment of meat authenticity using bioinformatics, targeted peptide biomarkers and high-resolution mass spectrometry / A. Ruiz Orduna, E. Husby, C.T. Yang, D. Ghosh, F. Beaudry // Food Additives & Contaminants: Part A. – 2015. – Vol. 32, № 10. – P. 1709-1717.

136. Montowska, M. Mass spectrometry detection of protein allergenic additives in emulsion-type pork sausages / M. Montowska, E. Fornal, M. Piątek, M. Krzywdzińska-Bartkowiak // Food Control. – 2019. – Vol. 104. – P. 122-131.

137. Bargen, von C. New sensitive high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the detection of horse and pork in halal beef / C. von Bargen, J.r. Dojahn, D. Waidelich, H.-U. Humpf, J. Brockmeyer // Journal of agricultural and food chemistry. – 2013. – Vol. 61, № 49. – P. 11986-11994.

138. Watson, A.D. Meat authentication via multiple reaction monitoring mass spectrometry of myoglobin peptides / A.D. Watson, Y. Gunning, N.M. Rigby, M. Philo, E.K. Kemsley // Analytical chemistry. – 2015. – Vol. 87, № 20. – P. 10315-10322.

139. Grundy, H. A mass spectrometry method for the determination of the species of origin of gelatine in foods and pharmaceutical products / H. Grundy, P. Reece, M. Buckley, C. Solazzo, A. Dowle, D. Ashford, A. Charlton, M. Wadsley, M. Collins // Food Chemistry. – 2016. – Vol. 190. – P. 276-284.

140. Yang, C.T. Detection of gelatin adulteration using bio-informatics, proteomics and high-resolution mass spectrometry / C.T. Yang, D. Ghosh, F. Beaudry // Food Additives & Contaminants: Part A. – 2018. – Vol. 35, № 4. – P. 599-608.

141. Guo, S. A rapid and simple UPLC-MS/MS method using collagen marker peptides for identification of porcine gelatin / S. Guo, X. Xu, X. Zhou, Y. Huang // RSC advances. – 2018. – Vol. 8, № 7. – P. 3768-3773.

142. Yilmaz, M.T. A novel method to differentiate bovine and porcine gelatins in food products: NanoUPLC-ESI-Q-TOF-MSE based data independent acquisition technique to detect marker peptides in gelatin / M.T. Yilmaz, Z. Kesmen, B. Baykal, O. Sagdic, O. Kulen, O. Kacar, H. Yetim, A.T. Baykal // Food Chemistry. – 2013. – Vol. 141, № 3. – P. 2450-2458.

143. Программное обеспечение MacCoss Lab [электронный ресурс]. – 2021. – Дата обращения: 21.06.2021. URL: https://skyline.ms/

144. Национальный центр биотехнологической информации [электронный ресурс]. – 2021. – Дата обращения: 21.06.2021. URL: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/

145. Khvostov, D. Идентификация и количественное определение мышечной ткани на основе контроля прототипических пептидов с использованием метода мониторинга заданных реакций / D. Khvostov, N. Vostrikova, A. Zherdev, E. Zvereva, A. Kurzova // Аналитика и контроль. – 2019. – Vol. 23, № 4. – P. 580-586.

146. Kulikovskii, A.V. Quantitative Identification of Muscle Tissue by Means of Biomarker Peptides by Using Method of Multiple Reaction Monitoring / A.V. Kulikovskii, N.L. Vostrikova, I.M. Chernukha, D.V. Khvostov // Oriental Journal of Chemistry. – 2019. – Vol. 35, № 4. – P. 1327.

147. Khvostov, D. Comparison of heat-stable peptides using a multiple-reaction monitoring method to identify beef muscle tissue / D. Khvostov, N. Vostrikova, I. Chernukha // Potravinarstvo. – 2020. – Т. 14. – №. 1. – С. 149-155.

148. Escriba-Perez, C. Consumer profile analysis for different types of meat in Spain / C. Escriba-Perez, A. Baviera-Puig, J. Buitrago-Vera, L. Montero-Vicente // Meat Science. – 2017. – Vol. 129. – P. 120-126. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.02.015

149. Khvostov, D. PSV-25 Detection of heart and aorta tissue peptide markers by the multiple-reaction monitoring method / D. Khvostov, N. Vostrikova, I. Chernukha // Journal of Animal Science. – 2020. – Vol. 98, № Supplement_4. – P. 362-363.

150. Хвостов, Д.В. Идентификация количества мышечной ткани по биомаркерным пептидам при помощи квадрупульной хромато-масспектрометрии / Д.В. Хвостов, Н.Л. Вострикова, И.М. Чернуха, А.В. Куликовский // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. – 2019. – Т. 161, № 3. – С. 490–499. https://doi.org/10.26907/2542-064X.2019.3.490-499

151. Vostrikova, N. Identification of tissue-specific proteins and peptides forming innovative meat products corrective properties to confirm authenticity of meat raw materials / N.y.L. Vostrikova, I.M. Chernukha // Foods & Raw Materials. – 2018. – Vol. 6, № 1. – С. 201-209.

152. Вострикова, Н. Методологические аспекты идентификации тканеспецифичных белков и пептидов, формирующих корригирующие свойства инновационных мясных продуктов / Н. Вострикова, И. Чернуха, Д. Хвостов // Теория и практика переработки мяса. – 2018. – Т. 3. – №. 3. – С. 36-55.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А

ALMABION

ООО «Алма-Бион» 394005, г. Воронеж, ул. Владимира Невского 59-166
Тел./факс: 8 (473) 273-48-28 8 (906) 677-72-99 www.almabion.ru e-mail: info@almabion.ru
ИНН 3662167582 КПП 366201001 ОГРН 1113668032829
Р/с 40702810808200018914 ОАО АКБ «АВАНГАРД» БИК 044525201 к/с 30101810000000000201

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

Продукт:	пептид
Lot No.	GTA70616-1
Quantity	4 mg
Sequence	SALAHAVQSSR
Length	11AA
Modification	N/A
Molecular Weight (MW)	1126.21
Storage	-20°C

Test Items	Specifications	Results
MW by MS	1126.30	Conforms
Purity by HPLC	>80%	97.509%
Peptide Content	N/A	N/A
Moisture content	N/A	N/A
Acetic acid content	N/A	N/A
Appearance	White to off-white lyophilized powder	Conforms
Quantity	4mg	4.0mg

ALMABION

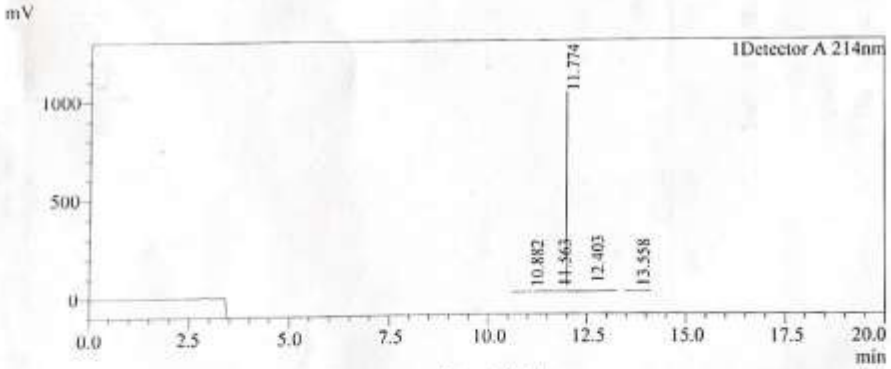
ООО «Алма-Бион» 394005, г. Воронеж, ул. Владимира Невского 59-166
Тел./факс: 8 (473) 273-48-28 8 (906) 677-72-99 www.almabion.ru e-mail: info@almabion.ru
ИНН 3662167582 КПП 366201001 ОГРН 1113668032829
Р/с 40702810808200018914 ОАО АКБ «АВАНГАРД» БИК 044525201 к/с 30101810000000000201

СЕРТИФИКАТ ВЭЖХ

Order ID :GTA70616-1
Sequence :SALAHAVQSSR
Pump A :0.1% Trifluoroacetic in 100% water
Pump B :0.1% Trifluoroacetic in 100% acetonitrile
Total Flow :1 ml/min
Wavelength :214 nm
Analytical column type :SHIMADZU Inertsil ODS-SP(4.6*250mm*5um)
Dissolution method :100%H_2O
Inj. Volume : 25ul

Time	Module	Action	Value
0.01	Pumps	B.Conc	10
20.00	Pumps	B.Conc	30
33.00	Pumps	B.Conc	100
38.00	Pumps	B.Conc	100
40.00	Pumps	B.Conc	10
50.00	Controller	Stop	

Chromatogram



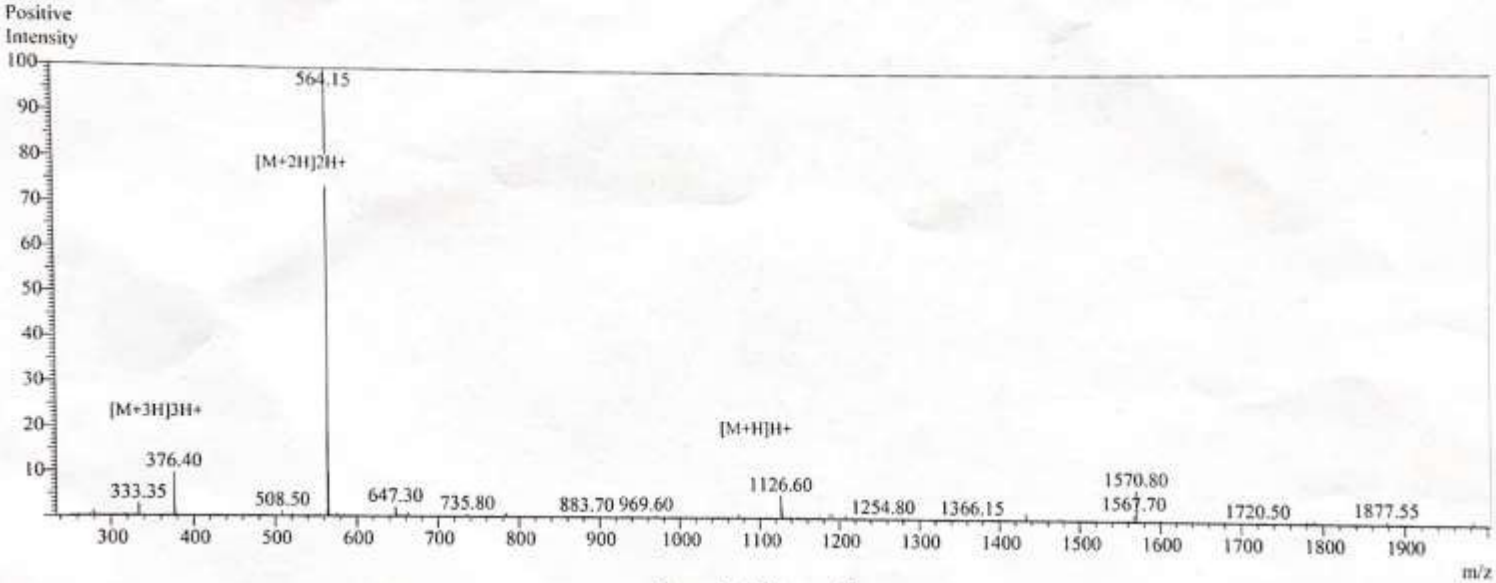
Peak Table

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area%
1	7.915	20450	1478	0.070
2	9.006	211714	9706	0.722
3	9.807	28614601	1700861	97.603
4	10.313	445059	29301	1.518
5	13.131	25563	2408	0.087
Total		29317387	1743753	100.000

ALMABION

ООО «Алма-Бион» 394005, г. Воронеж, ул. Владимира Невского 59-166
Тел./факс: 8 (473) 273-48-28 8 (906) 677-72-99 www.almabion.ru e-mail: info@almabion.ru
ИНН 3662167582 КПП 366201001 ОГРН 1113668032829
Р/с 40702810808200018914 ОАО АКБ «АВАНГАРД» БИК 044525201 к/с 30101810000000000201

СЕРТИФИКАТ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ



Sample Information

Dissolution method	:5%HAC+8%ACN+87%H2O	Interface: ESI	
Injection Volume	:0.2ul	Nebulizing Gas Flow: 1.50L/min	
Block Temp	200	CDL Temp: 250C	
Order ID	:GTA70616-1	CDL Volt: 0v	
Sequence	:SALAHAVQSSR	Prerod Bias: +4.5kv	
Theoretical	:1126.21	Detector: -0.2kv	
Observed	:1126.30	T.Flow: 0.2ml/min	B.conc : 50%H2O/50%MEOH

ALMABION

ООО «Алма-Бион» 394005, г. Воронеж, ул. Владимира Невского 59-166
Тел./факс: 8 (473) 273-48-28 8 (906) 677-72-99 www.almabion.ru e-mail: info@almabion.ru
ИНН 3662167502 КПП 366201001 ОГРН 1113668032829
Р/с 40702810008200018914 ОАО АКБ «АВАНГАРД» БИК 044525201 к/с 30101810000000000201

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

Продукт:	пептид
Lot No.	GTA70616-2
Quantity	4 mg
Sequence	NDMAAQYK
Length	8AA
Modification	N/A
Molecular Weight (MW)	940.03
Storage	-20°C

Test Items	Specifications	Results
MW by MS	940.03	Conforms
Purity by HPLC	>80%	97.276%
Peptide Content	N/A	N/A
Moisture content	N/A	N/A
Acetic acid content	N/A	N/A
Appearance	White to off-white lyophilized powder	Conforms
Quantity	4mg	4.0mg

ALMABION

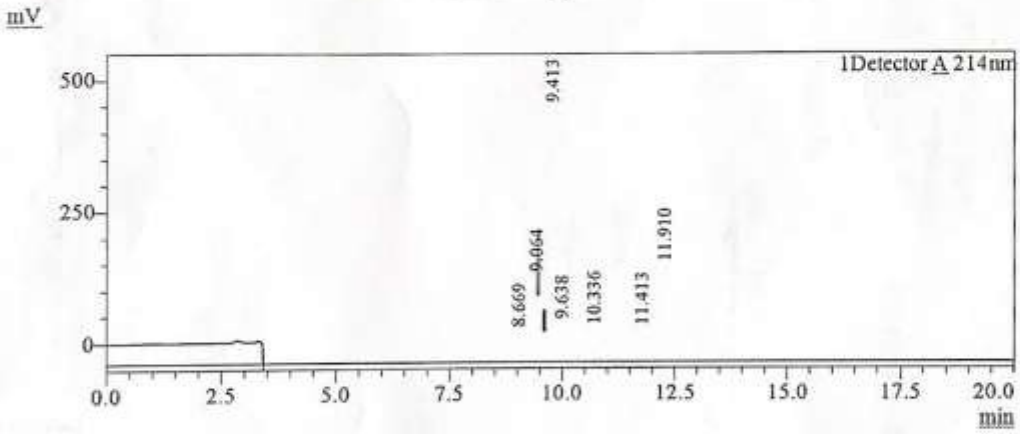
ООО «Алма-Бион» 394005, г. Воронеж, ул. Владимира Невского 59-166
Тел./факс: 8 (473) 273-48-28 8 (906) 677-72-99 www.almabion.ru e-mail: info@almabion.ru
ИНН 3662167582 КПП 366201001 ОГРН 1113668032829
Р/с 40702810808200018914 ОАО АКБ «АВАНГАРД» БИК 044525201 к/с 30101810000000000201

СЕРТИФИКАТ ВЭЖХ

Order ID :GTA70616-2
Sequence : NDMAAQYK
Pump A :0.1% Trifluoroacetic in 100% water
Pump B :0.1% Trifluoroacetic in 100% acetonitrile
Total Flow :1 ml/min
Wavelength :214 nm
Analytical column type :SHIMADZU Inertsil ODS-SP(4.6*250mm*5um)
Dissolution method :100%H_2O
Inj. Volume : 25ul

Time	Module	Action	Value
0.01	Pumps	B.Conc	10
20.00	Pumps	B.Conc	30
33.00	Pumps	B.Conc	100
38.00	Pumps	B.Conc	100
40.00	Pumps	B.Conc	10
50.00	Controller	Stop	

Chromatogram



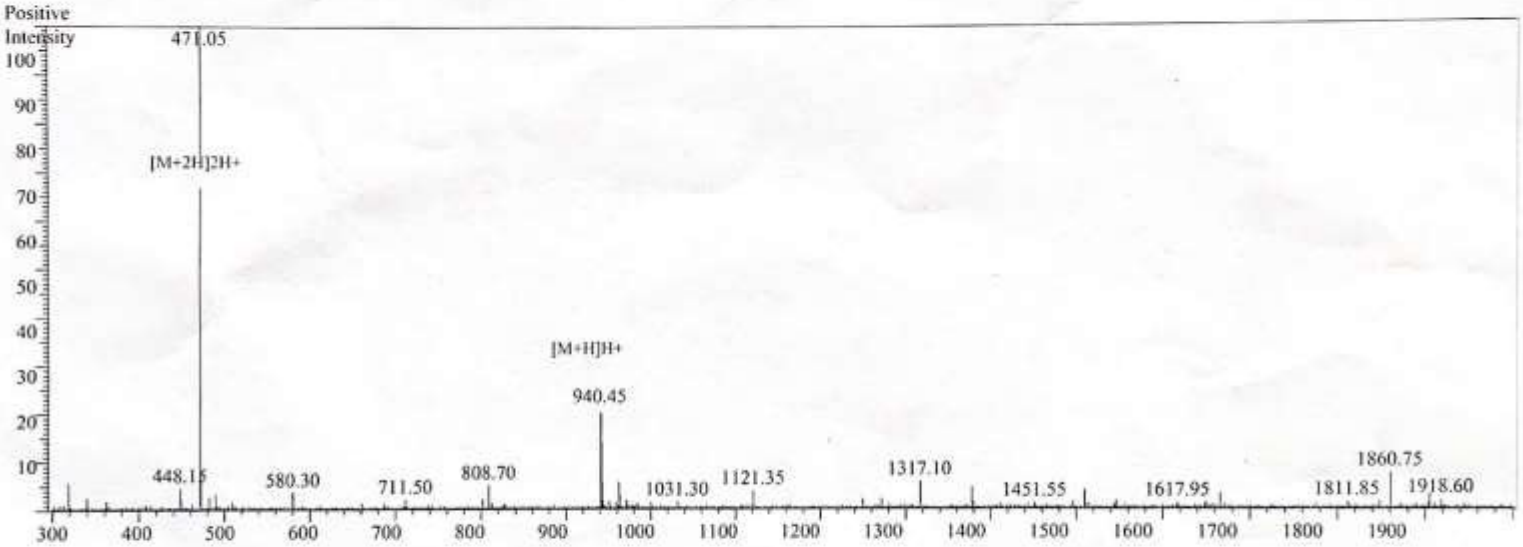
Peak Table

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area%
1	8.669	2368	159	0.054
2	9.064	8055	947	0.184
3	9.413	4268633	508602	97.276
4	9.638	72346	13450	1.649
5	10.336	21459	2947	0.489
6	11.413	13461	482	0.307
7	11.910	1853	308	0.042
Total		4388176	526895	100.000

ALMABION

ООО «Алма-Бион» 394005, г. Воронеж, ул. Владимира Невского 59-166
Тел./факс: 8 (473) 273-48-28 8 (906) 677-72-99 www.almabion.ru e-mail: info@almabion.ru
ИНН 3662167582 КПП 366201001 ОГРН 1113668032829
Р/с 40702810808200018914 ОАО АКБ «АВАНГАРД» БИК 044525201 к/с 30101810000000000201

СЕРТИФИКАТ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ



Sample Information

Dissolution method :5%HAC+8%ACN+87%H2O
Injection Volume :0.2ul
Block Temp 200

Order ID :GTA70616-2
Sequence : NDMAAQYK
Theoretical : 940.03
Observed : 940.10

Interface: ESI
Nebulizing Gas Flow: 1.50L/min
CDL Temp: 250C

CDL Volt: 0v
Prerod Bias: +4.5kv
Detector: -0.2kv
T.Flow: 0.2ml/min

B.conc : 50%H2O/50%MEOH

Приложение Б

Уральский научно-исследовательский институт метрологии - филиал
Федерального государственного унитарного предприятия
«Всероссийский научно-исследовательский институт метрологии им.Д.И.Менделеева»
(УНИИМ – филиал ФГУП «ВНИИМ им.Д.И.Менделеева»)

620075, Свердловская область, г. Екатеринбург, ул. Красноармейская, 4
тел: +7(343)350-26-18, факс: +7(343)350-20-39, uniim@uniim.ru, www.uniim.ru

Уникальный номер записи об аккредитации в реестре аккредитованных лиц RA.RU.311866

ВНИИМ
им. Д.И.Менделеева

СВИДЕТЕЛЬСТВО

об аттестации методики (метода) измерений

№ 241.0067/RA.RU.311866/2021

Методика измерений массовой доли мясного ингредиента кур в пробах мясной
наименование методики, включая указание измеряемой величины, шкалы величины (шкалы измерений),
продукции, выработанной по национальным и межгосударственным стандартам
объекта, диапазона и реализуемый способ измерений и, при необходимости, наименование дополнительных параметров
(за исключением консервов), методом флуоресценции для детектирования продуктов

полимеразной цепной реакции в реальном времени,

разработанная ФГБНУ "ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова" РАН, г. Москва,
наименование и адрес организации (предприятия), разработавшей методику
ул. Талалихина, 26,

содержащаяся в Методических рекомендациях "Продукция мясной промышленности.
обозначение и наименование документа, содержащего методику, год утверждения, число страниц
Выявление ДНК кур и расчет количества мясного ингредиента кур в мясной продукции,

выработанной по национальным и межгосударственным стандартам (за исключением

консервов), методом полимеразной цепной реакции в реальном времени", утв. в 2021 г.,

на 25 стр.

Аттестация проведена на основе экспериментальных исследований.
теоретических и (или) экспериментальных исследований

Методика измерений аттестована в соответствии с Приказом Минпромторга России от 15.12.2015 г. № 4091

В результате аттестации методики измерений установлено, что методика измерений соответствует метрологическим требованиям, приведенным в Федеральном законе от 26.06.2008 г. № 102-ФЗ "Об обеспечении единства измерений"

ГОСТ Р 8.563-2009, ТЗ ФГБНУ "ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова" РАН.
другие нормативные правовые акты Российской Федерации, нормативные документы (при наличии)

Показатели точности измерений приведены в приложении на 1 л., являющемся неотъемлемой частью настоящего свидетельства.

И.о. директора филиала **Е.П. Собина**

Зав. лабораторией **М.Ю. Медведевских**

Дата выдачи 04.08.2021

М.П.

ПРИЛОЖЕНИЕ
К СВИДЕТЕЛЬСТВУ № 241.0067/RA.RU.311866/2021
об аттестации методики измерений массовой доли мясного ингредиента кур в пробах мясной продукции, выработанной по национальным и межгосударственным стандартам (за исключением консервов), методом флуоресценции для детектирования продуктов полимеразной цепной реакции в реальном времени, содержащейся в Методических рекомендациях «Продукция мясной промышленности. Выявление ДНК кур и расчет количества мясного ингредиента кур в мясной продукции, выработанной по национальным и межгосударственным стандартам (за исключением консервов), методом полимеразной цепной реакции в реальном времени»

на 1 листе

Выполнение измерений по настоящей методике обеспечивает получение результатов измерений массовой доли мясного ингредиента кур в пробах мясной продукции в диапазоне измерений от 0,1 % до 10 % включ. и с характеристиками относительной погрешности измерений при доверительной вероятности P = 0,95, приведенными в таблице 1.

Таблица 1 – Значения показателей точности, правильности, повторяемости и воспроизводимости

В процентах

Показатель повторяемости (относительное среднее квадратическое отклонение повторяемости), σ_{r0}	Показатель воспроизводимости (относительное среднее квадратическое отклонение воспроизводимости), σ_{R0}	Показатель правильности (границы относительной неисключенной систематической погрешности при доверительной вероятности P=0,95), $\pm\delta_c$	Показатель точности (границы относительной погрешности при доверительной вероятности P=0,95), $\pm\delta$
8	11	13	25

Показатели точности методики измерений были оценены в ходе межлабораторного эксперимента с участием 3 лабораторий, организованного в 2021 г.

Зав. лаб. 241,
эксперт-метролог
№ RUM 02.3325.0772-2
от 23.12.2019
04.08.2021

М.Ю. Медведевских

ФГБНУ «ФНЦ ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ ИМ. В.М. ГОРБАТОВА» РАН

УТВЕРЖДАЮ

Директор «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН

_____ О.А. Кузнецова

"04" августа 2021 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

ПРОДУКЦИЯ МЯСНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ. ВЫЯВЛЕНИЕ ДНК КУР И РАСЧЕТ КОЛИЧЕСТВА МЯСНОГО ИНГРЕДИЕНТА КУР В МЯСНОЙ ПРОДУКЦИИ, ВЫРАБОТАННОЙ ПО НАЦИОНАЛЬНЫМ И МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫМ СТАНДАРТАМ (ЗА ИСКЛЮЧЕНИЕМ КОНСЕРВОВ), МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Москва
2021

ПРЕДИСЛОВИЕ

СВЕДЕНИЯ О РАЗРАБОТКЕ И АТТЕСТАЦИИ

1 РАЗРАБОТАНА: Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН (ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН), 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26

Научно-исследовательский испытательный центр (НИИЦ)

Руководитель НИИЦ — Вострикова Н.Л.

Заведующий лабораторией молекулярной биологии и биоинформатики — Минаев М.Ю.

м.н.с лаборатории молекулярной биологии и биоинформатики — Хвостов Д.В.

2 ВВЕДЕНА ВПЕРВЫЕ

3 АТТЕСТОВАНА: Уральским научно-исследовательский институтом метрологии – филиалом Федерального государственного унитарного предприятия «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологии им.Д.И.Менделеева» (УНИИМ - филиал ФГУП «ВНИИМ им.Д.И.Менделеева»), 620075, г. Екатеринбург, ул. Красноармейская, 4

Заведующий лабораторией метрологии влагометрии и стандартных образцов — Медведевских М.Ю.

Старший научный сотрудник лаборатории метрологии влагометрии и стандартных образцов — Сергеева А.С.

Инженер 1 категории Отдела государственной службы стандартных образцов — Студенок В.В.

УНИИМ – филиал ФГУП «ВНИИМ им.Д.И.Менделеева» аккредитован на проведение работ по аттестации методик (методов) измерений и проведение метрологической экспертизы. Номер аттестата аккредитации RA.RU.311866 от 07.09.2016 г.

Свидетельство об аттестации методики измерений № 241.0067/RA.RU.311866/2021 от «04» августа 2021 г.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б
(справочное)

МЕТОДИКА ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИДОСПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ В ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ ПО ПРОТЕОТИПИЧЕСКИМ ПЕПТИДАМ

Б.1 Область применения

Настоящая методика идентификации предназначена для скринингового анализа видового состава готовой мясных и мясосодержащих продуктов, в том числе для выявления незаявленных компонентов.

Идентификация мышечных тканей курицы, а также говядины и свинины, проводится по видо- и ткане- специфическим протеотипическим пептидам (таблица Б.1) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором (ВЭЖХ-МС/МС).

Таблица Б.1 – Метрологические характеристики методики идентификации

Показатель	Биомаркер
М.ТК говядины	YLEFISDAIIHVLHAK (NDMAAQYK – подтверждающий) HPSDFGADAQAAMSK – фарши
М.ТК свинины	YLEFISEAIIQVLQSK (SALAHAVQSSR – подтверждающий)
М.ТК курицы	VAGAALPCAPAVK

Б.2 Нормативные ссылки

В настоящей методике использованы следующие нормативные ссылки:

ГОСТ 12.1.004–91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.007–76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ Р 12.1.019–2009 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.4.009–83 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ OIML R 76-1–2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ 1770–74 (ИСО 1042−83, ИСО 4788−80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ Р 52501–2005 (ИСО 3696:1987) Вода для лабораторного анализа. Технические условия

ГОСТ 4025–95 Мясорубки бытовые. Технические условия

ГОСТ Р ИСО 5725-2–2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений

ГОСТ Р ИСО 5725-6–2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ Р 58144–2018 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 7269–2015 Мясо. Методы отбора образцов и органолептические методы определения свежести

ГОСТ 9792–73 Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц. Правила приемки и методы отбора проб

Приложение В

Полный отчет количественного анализа

Agilent Technologies

Папка серии	H:\Даниил\data\2018_07_20_DH\QuantResults\bovpigpept4.batch.bin		
Время анализа	27.09.2018 16:52	Имя аналитика	DESKTOP-LVU7VOH\admin
Время отчета	29.09.2018 12:40:00	Имя составителя отчета	DESKTOP-LVU7VOH\admin
Последн. обновл. калиб.	27.09.2018 16:52	Состояние серии	Processed
Версия серии колич. анал	B.09.00	Версия Quant Report	B.09.00

Файл данных	Название пробы	Тип пробы	Положение	Введ. кол-во	Уровень	Метод сб. д
DH Bov100.d	DH Bov100	Кал.	Vial 1	-1	6	N_peptide_main_gel.m
DH5 Bov75Pig25.d	DH5 Bov75Pig25	Кал.	Vial 2	-1	5	N_peptide_main_gel.m
DH6 Bov50Pig50.d	DH6 Bov50Pig50	Кал.	Vial 3	-1	4	N_peptide_main_gel.m
DH7 Bov25Pig75.d	DH7 Bov25Pig75	Кал.	Vial 4	-1	3	N_peptide_main_gel.m
DH10 Bov5Pig95.d	DH10 Bov5Pig95	Кал.	Vial 5	-1	2	N_peptide_main_gel.m
DH Pig100.d	DH Pig100	Кал.	Vial 6	-1	1	N_peptide_main_gel.m

Результаты количеств. анализа

THVSEAVAQSTR.light

Файл данных	Соединение	Тип пробы	ВУ	Откл.	Итоговая конц-я	Ожид. Конц	Точночть
DH Bov100.d	THVSEAVAQSTR.light	Calibration	4,045	21	ND	0,0000	
DH5 Bov75Pig25.d	THVSEAVAQSTR.light	Calibration	3,634	863	25,8920	25,0000	103,6
DH6 Bov50Pig50.d	THVSEAVAQSTR.light	Calibration	3,580	1594	48,6802	50,0000	97,4
DH7 Bov25Pig75.d	THVSEAVAQSTR.light	Calibration	3,628	2483	76,4027	75,0000	101,9
DH10 Bov5Pig95.d	THVSEAVAQSTR.light	Calibration	3,612	3084	95,1591	95,0000	100,2
DH Pig100.d	THVSEAVAQSTR.light	Calibration	3,520	3215	99,2338	100,0000	99,2

NDMAAQYK.light

Файл данных	Соединение	Тип пробы	ВУ	Откл.	Итоговая конц-я	Ожид. Конц	Точночть
DH Bov100.d	NDMAAQYK.light	Calibration	5,482	135535	105,7684	100,0000	105,8
DH5 Bov75Pig25.d	NDMAAQYK.light	Calibration	5,201	85895	68,0176	75,0000	90,7
DH6 Bov50Pig50.d	NDMAAQYK.light	Calibration	5,169	60809	48,9401	50,0000	97,9
DH7 Bov25Pig75.d	NDMAAQYK.light	Calibration	5,196	29481	25,1155	25,0000	100,5
DH10 Bov5Pig95.d	NDMAAQYK.light	Calibration	5,201	2229	4,3906	5,0000	87,8
DH Pig100.d	NDMAAQYK.light	Calibration	5,336	95	2,7678	0,0000	

SNVSDAVAQSAR.light

Файл данных	Соединение	Тип пробы	ВУ	Откл.	Итоговая конц-я	Ожид. Конц	Точночть
DH Bov100.d	SNVSDAVAQSAR.light	Calibration	5,837	13413	98,1360	100,0000	98,1
DH5 Bov75Pig25.d	SNVSDAVAQSAR.light	Calibration	5,691	10450	75,7717	75,0000	101,0
DH6 Bov50Pig50.d	SNVSDAVAQSAR.light	Calibration	5,691	7271	51,7719	50,0000	103,5
DH7 Bov25Pig75.d	SNVSDAVAQSAR.light	Calibration	5,718	3924	26,5175	25,0000	106,1
DH10 Bov5Pig95.d	SNVSDAVAQSAR.light	Calibration	5,658	1126	5,3975	5,0000	108,0
DH Pig100.d	SNVSDAVAQSAR.light	Calibration	5,886	67	ND	0,0000	

HPSDFGADAQAAMSK.light

Файл данных	Соединение	Тип пробы	ВУ	Откл.	Итоговая конц-я	Ожид. Конц	Точночть
DH Bov100.d	HPSDFGADAQAAMSK.light	Calibration	6,303	447623	98,6774	100,0000	98,7

Полный отчет количественного анализа

Agilent Technologies

HPSDFGADAQAAMSK.light

Файл данных	Соединение	Тип пробы	ВУ	Откл.	Итоговая конц-я	Ожид. Конц	Точночть
DH5 Bov75Pig25.d	HPSDFGADAQAAMSK.light	Calibration	6,206	344559	75,6194	75,0000	100,8
DH6 Bov50Pig50.d	HPSDFGADAQAAMSK.light	Calibration	6,211	232911	50,6407	50,0000	101,3
DH7 Bov25Pig75.d	HPSDFGADAQAAMSK.light	Calibration	6,216	128917	27,3747	25,0000	109,5
DH10 Bov5Pig95.d	HPSDFGADAQAAMSK.light	Calibration	6,195	23909	3,8816	5,0000	77,6
DH Pig100.d	HPSDFGADAQAAMSK.light	Calibration	6,211	1224	ND	0,0000	

HPGDFGADAQGAMSK.light

Файл данных	Соединение	Тип пробы	ВУ	Откл.	Итоговая конц-я	Ожид. Конц	Точночть
DH Bov100.d	HPGDFGADAQGAMSK.light	Calibration	6,823	9215	6,9731	0,0000	
DH5 Bov75Pig25.d	HPGDFGADAQGAMSK.light	Calibration	6,785	11505	20,5787	25,0000	82,3
DH6 Bov50Pig50.d	HPGDFGADAQGAMSK.light	Calibration	6,758	15627	45,0592	50,0000	90,1
DH7 Bov25Pig75.d	HPGDFGADAQGAMSK.light	Calibration	6,828	19568	68,4690	75,0000	91,3
DH10 Bov5Pig95.d	HPGDFGADAQGAMSK.light	Calibration	6,828	25537	103,9200	95,0000	109,4
DH Pig100.d	HPGDFGADAQGAMSK.light	Calibration	6,785	65920	343,7849	100,0000	343,8

YLEFISDAIIHVLHAK.light

Файл данных	Соединение	Тип пробы	ВУ	Откл.	Итоговая конц-я	Ожид. Конц	Точночть
DH Bov100.d	YLEFISDAIIHVLHAK.light	Calibration	9,308	797939	93,5609	100,0000	93,6
DH5 Bov75Pig25.d	YLEFISDAIIHVLHAK.light	Calibration	9,303	677748	79,0392	75,0000	105,4
DH6 Bov50Pig50.d	YLEFISDAIIHVLHAK.light	Calibration	9,287	491217	56,5023	50,0000	113,0
DH7 Bov25Pig75.d	YLEFISDAIIHVLHAK.light	Calibration	9,308	239770	26,1219	25,0000	104,5
DH10 Bov5Pig95.d	YLEFISDAIIHVLHAK.light	Calibration	9,308	44763	2,5608	5,0000	51,2
DH Pig100.d	YLEFISDAIIHVLHAK.light	Calibration	9,308	517	ND	0,0000	

YLEFISEAIIQVLQSK.light

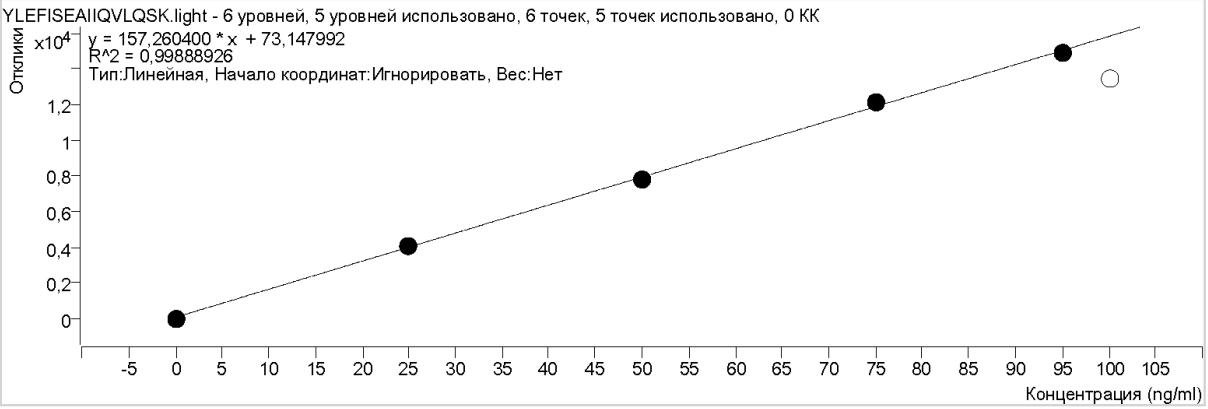
Файл данных	Соединение	Тип пробы	ВУ	Откл.	Итоговая конц-я	Ожид. Конц	Точночть
DH Bov100.d	YLEFISEAIIQVLQSK.light	Calibration	10,243	18	ND	0,0000	
DH5 Bov75Pig25.d	YLEFISEAIIQVLQSK.light	Calibration	10,173	4095	25,5731	25,0000	102,3
DH6 Bov50Pig50.d	YLEFISEAIIQVLQSK.light	Calibration	10,200	7779	49,0032	50,0000	98,0
DH7 Bov25Pig75.d	YLEFISEAIIQVLQSK.light	Calibration	10,216	12169	76,9162	75,0000	102,6
DH10 Bov5Pig95.d	YLEFISEAIIQVLQSK.light	Calibration	10,216	14834	93,8610	95,0000	98,8
DH Pig100.d	YLEFISEAIIQVLQSK.light	Calibration	10,232	13410	84,8087	100,0000	84,8

Полный отчет количественного анализа

Agilent Technologies

Папка серии	H:\Даниил\data\2018_07_20_DH\QuantResults\bovpigpept4.batch.bin		
Время анализа	27.09.2018 16:52	**Имя аналитика**	DESKTOP-LVU7VOH\admin
Время отчета	29.09.2018 12:40:03	**Имя составителя отчета**	DESKTOP-LVU7VOH\admin
Последн. обновл. калиб.	27.09.2018 16:52	**Состояние серии**	Processed
Версия серии колич. анал	B.09.00	**Версия Quant Report**	B.09.00

YLEFISEAIIQVLQSK.light



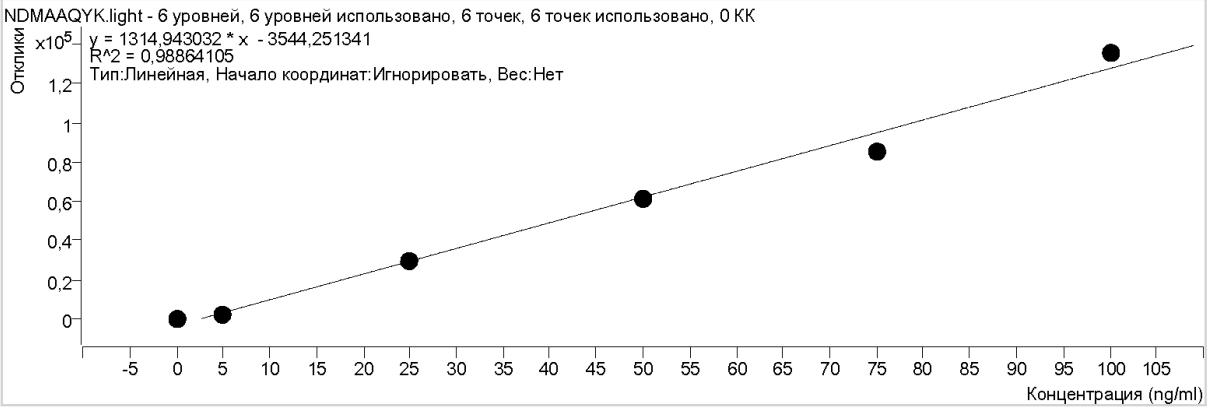
Станд. папка калибровки	Тип калибр.	Уровень	Включено	Откл.	Ожид. Конц	Коэф. отклика
DH Bov100.d	Калибровка	6	x	18	0,0000	∞
DH5 Bov75Pig25.d	Калибровка	5	x	4095	25,0000	163,7914
DH6 Bov50Pig50.d	Калибровка	4	x	7779	50,0000	155,5884
DH7 Bov25Pig75.d	Калибровка	3	x	12169	75,0000	162,2536
DH10 Bov5Pig95.d	Калибровка	2	x	14834	95,0000	156,1449
DH Pig100.d	Калибровка	1		13410	100,0000	134,1019

Полный отчет количественного анализа

Agilent Technologies

Папка серии	H:\Даниил\data\2018_07_20_DH\QuantResults\bovpigpept4.batch.bin		
Время анализа	27.09.2018 16:52	**Имя аналитика**	DESKTOP-LVU7VOH\admin
Время отчета	29.09.2018 12:40:03	**Имя составителя отчета**	DESKTOP-LVU7VOH\admin
Последн. обновл. калиб.	27.09.2018 16:52	**Состояние серии**	Processed
Версия серии колич. анал	B.09.00	**Версия Quant Report**	B.09.00

NDMAAQYK.light



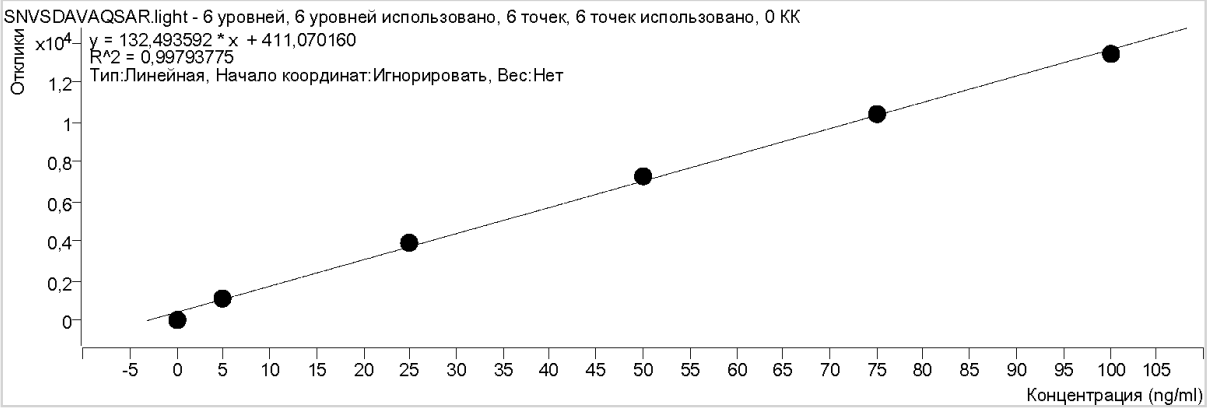
Станд. папка калибровки	Тип калибр.	Уровень	Включено	Откл.	Ожид. Конц	Коэф. отклика
DH Pig100.d	Калибровка	1	x	95	0,0000	∞
DH10 Bov5Pig95.d	Калибровка	2	x	2229	5,0000	445,8308
DH7 Bov25Pig75.d	Калибровка	3	x	29481	25,0000	1179,2487
DH6 Bov50Pig50.d	Калибровка	4	x	60809	50,0000	1216,1836
DH5 Bov75Pig25.d	Калибровка	5	x	85895	75,0000	1145,2663
DH Bov100.d	Калибровка	6	x	135535	100,0000	1355,3513

Полный отчет количественного анализа

Agilent Technologies

Папка серии	H:\Даниил\data\2018_07_20_DH\QuantResults\bovpigpept4.batch.bin		
Время анализа	27.09.2018 16:52	**Имя аналитика**	DESKTOP-LVU7VOH\admin
Время отчета	29.09.2018 12:40:03	**Имя составителя отчета**	DESKTOP-LVU7VOH\admin
Последн. обновл. калиб.	27.09.2018 16:52	**Состояние серии**	Processed
Версия серии колич. анал	B.09.00	**Версия Quant Report**	B.09.00

SNVSDAVAQSAR.light



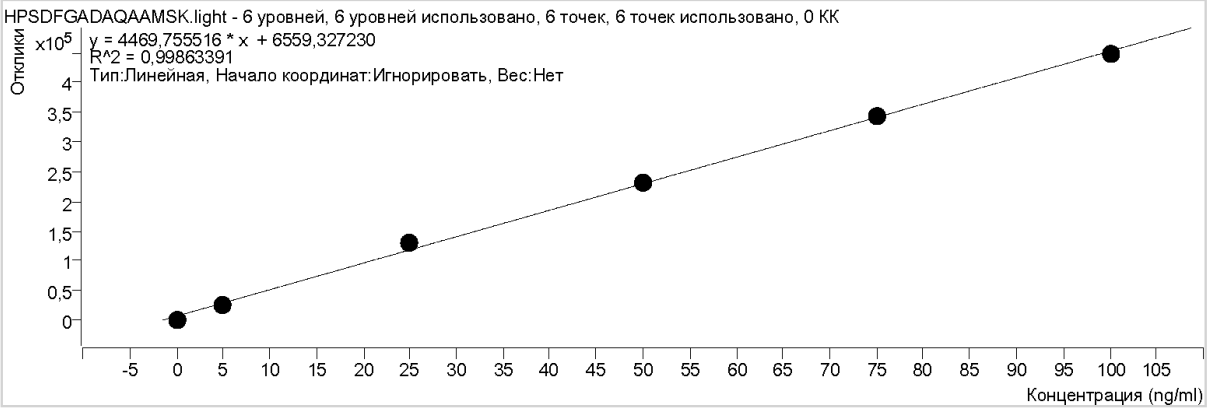
Станд. папка калибровки	Тип калибр.	Уровень	Включено	Откл.	Ожид. Конц	Коэф. отклика
DH Pig100.d	Калибровка	1	x	67	0,0000	∞
DH10 Bov5Pig95.d	Калибровка	2	x	1126	5,0000	225,2422
DH7 Bov25Pig75.d	Калибровка	3	x	3924	25,0000	156,9786
DH6 Bov50Pig50.d	Калибровка	4	x	7271	50,0000	145,4104
DH5 Bov75Pig25.d	Калибровка	5	x	10450	75,0000	139,3379
DH Bov100.d	Калибровка	6	x	13413	100,0000	134,1346

Полный отчет количественного анализа

Agilent Technologies

Папка серии	H:\Даниил\data\2018_07_20_DH\QuantResults\bovpigpept4.batch.bin		
Время анализа	27.09.2018 16:52	**Имя аналитика**	DESKTOP-LVU7VOH\admin
Время отчета	29.09.2018 12:40:03	**Имя составителя отчета**	DESKTOP-LVU7VOH\admin
Последн. обновл. калиб.	27.09.2018 16:52	**Состояние серии**	Processed
Версия серии колич. анал	B.09.00	**Версия Quant Report**	B.09.00

HPSDFGADAQAAMSK.light



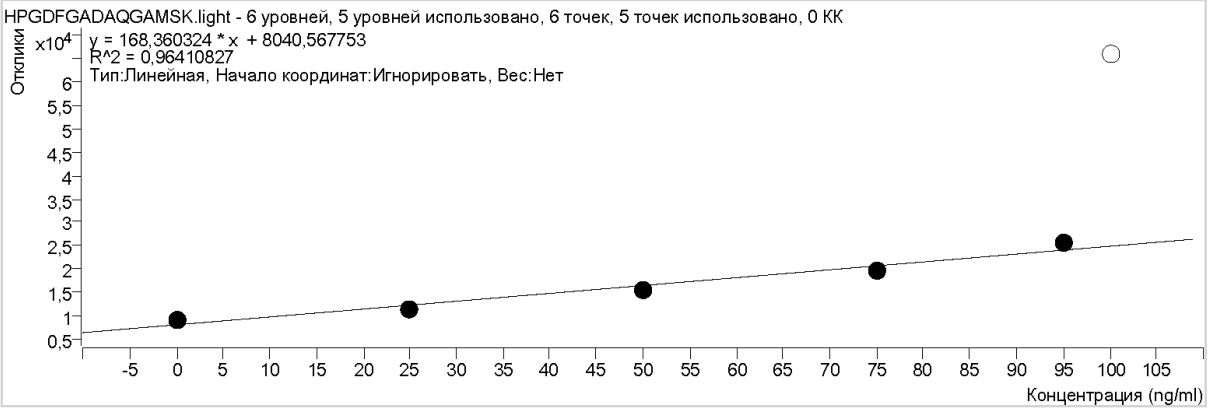
Станд. папка калибровки	Тип калибр.	Уровень	Включено	Откл.	Ожид. Конц	Коэф. отклика
DH Pig100.d	Калибровка	1	x	1224	0,0000	∞
DH10 Bov5Pig95.d	Калибровка	2	x	23909	5,0000	4781,7843
DH7 Bov25Pig75.d	Калибровка	3	x	128917	25,0000	5156,6947
DH6 Bov50Pig50.d	Калибровка	4	x	232911	50,0000	4658,2180
DH5 Bov75Pig25.d	Калибровка	5	x	344559	75,0000	4594,1250
DH Bov100.d	Калибровка	6	x	447623	100,0000	4476,2311

Полный отчет количественного анализа

Agilent Technologies

Папка серии	H:\Даниил\data\2018_07_20_DH\QuantResults\bovpigpept4.batch.bin		
Время анализа	27.09.2018 16:52	**Имя аналитика**	DESKTOP-LVU7VOH\admin
Время отчета	29.09.2018 12:40:03	**Имя составителя отчета**	DESKTOP-LVU7VOH\admin
Последн. обновл. калиб.	27.09.2018 16:52	**Состояние серии**	Processed
Версия серии колич. анал	B.09.00	**Версия Quant Report**	B.09.00

HPGDFGADAQGAMSK.light



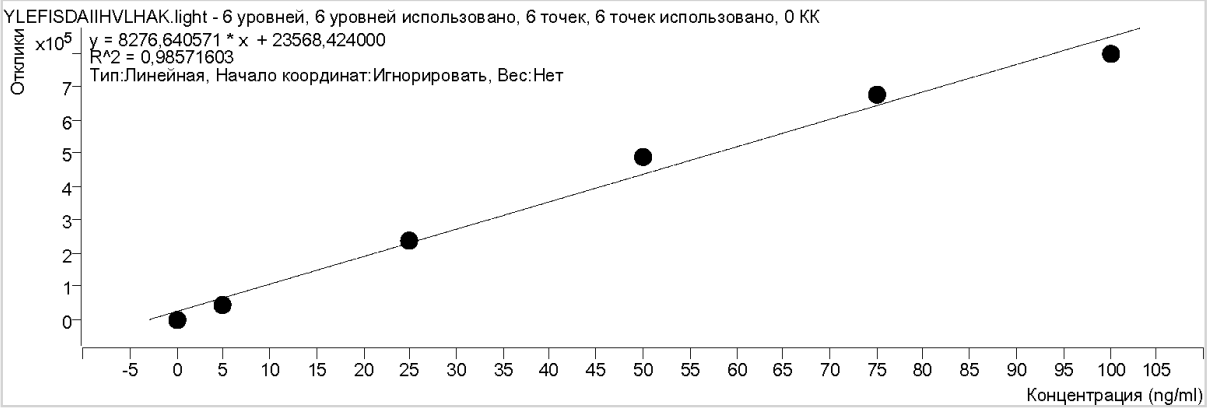
Станд. папка калибровки	Тип калибр.	Уровень	Включено	Откл.	Ожид. Конц	Коэф. отклика
DH Bov100.d	Калибровка	6	x	9215	0,0000	∞
DH5 Bov75Pig25.d	Калибровка	5	x	11505	25,0000	460,2081
DH6 Bov50Pig50.d	Калибровка	4	x	15627	50,0000	312,5350
DH7 Bov25Pig75.d	Калибровка	3	x	19568	75,0000	260,9070
DH10 Bov5Pig95.d	Калибровка	2	x	25537	95,0000	268,8060
DH Pig100.d	Калибровка	1		65920	100,0000	659,2031

Полный отчет количественного анализа

Agilent Technologies

Папка серии	H:\Даниил\data\2018_07_20_DH\QuantResults\bovpigpept4.batch.bin		
Время анализа	27.09.2018 16:52	**Имя аналитика**	DESKTOP-LVU7VOH\admin
Время отчета	29.09.2018 12:40:03	**Имя составителя отчета**	DESKTOP-LVU7VOH\admin
Последн. обновл. калиб.	27.09.2018 16:52	**Состояние серии**	Processed
Версия серии колич. анал	B.09.00	**Версия Quant Report**	B.09.00

YLEFISDAIIHVLHAK.light



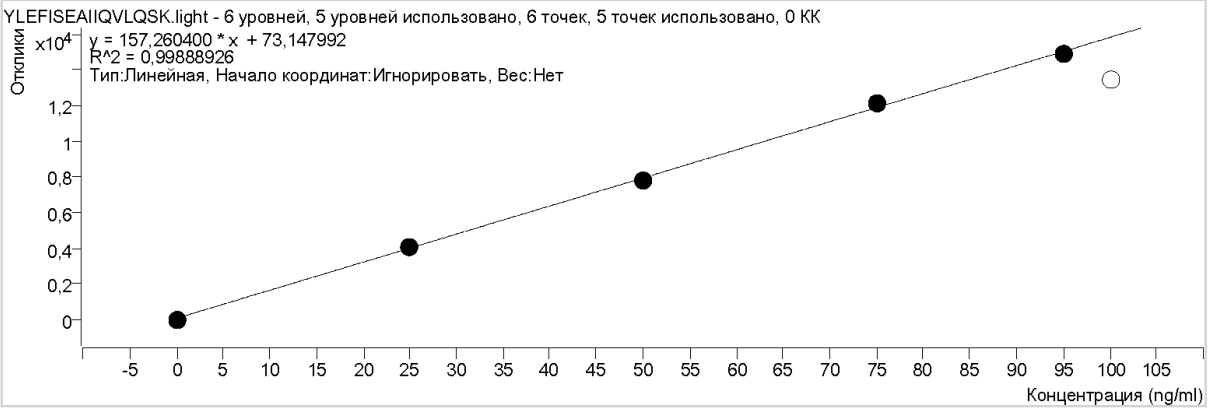
Станд. папка калибровки	Тип калибр.	Уровень	Включено	Откл.	Ожид. Конц	Коэф. отклика
DH Pig100.d	Калибровка	1	x	517	0,0000	∞
DH10 Bov5Pig95.d	Калибровка	2	x	44763	5,0000	8952,5867
DH7 Bov25Pig75.d	Калибровка	3	x	239770	25,0000	9590,8145
DH6 Bov50Pig50.d	Калибровка	4	x	491217	50,0000	9824,3493
DH5 Bov75Pig25.d	Калибровка	5	x	677748	75,0000	9036,6339
DH Bov100.d	Калибровка	6	x	797939	100,0000	7979,3862

Полный отчет количественного анализа

Agilent Technologies

Папка серии	H:\Даниил\data\2018_07_20_DH\QuantResults\bovpigpept4.batch.bin		
Время анализа	27.09.2018 16:52	**Имя аналитика**	DESKTOP-LVU7VOH\admin
Время отчета	29.09.2018 12:40:03	**Имя составителя отчета**	DESKTOP-LVU7VOH\admin
Последн. обновл. калиб.	27.09.2018 16:52	**Состояние серии**	Processed
Версия серии колич. анал	B.09.00	**Версия Quant Report**	B.09.00

YLEFISEAIIQVLQSK.light



Станд. папка калибровки	Тип калибр.	Уровень	Включено	Откл.	Ожид. Конц	Коэф. отклика
DH Bov100.d	Калибровка	6	x	18	0,0000	∞
DH5 Bov75Pig25.d	Калибровка	5	x	4095	25,0000	163,7914
DH6 Bov50Pig50.d	Калибровка	4	x	7779	50,0000	155,5884
DH7 Bov25Pig75.d	Калибровка	3	x	12169	75,0000	162,2536
DH10 Bov5Pig95.d	Калибровка	2	x	14834	95,0000	156,1449
DH Pig100.d	Калибровка	1		13410	100,0000	134,1019

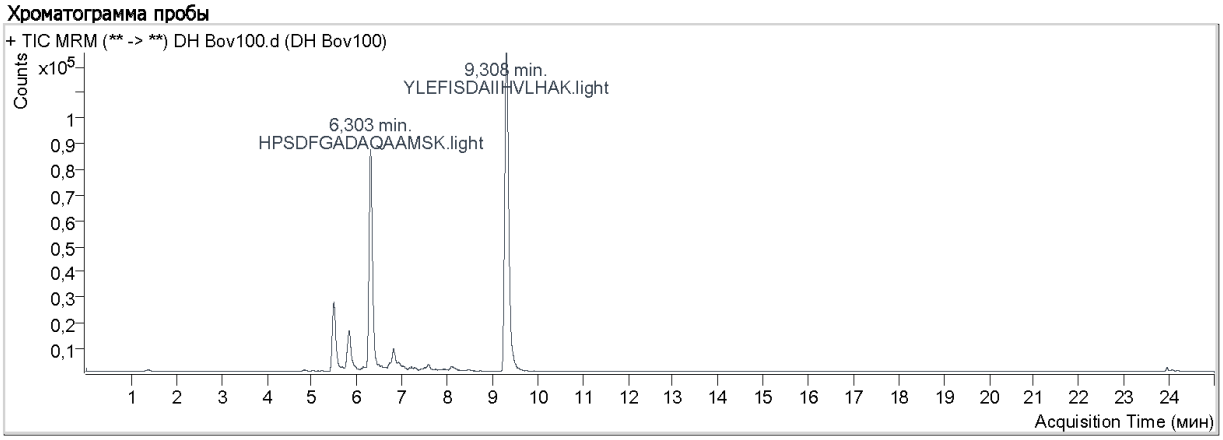
Полный отчет количественного анализа

Agilent Technologies

Папка серии	H:\Даниил\data\2018_07_20_DH\QuantResults\bovpigpept4.batch.bin		
Время анализа	27.09.2018 16:52	**Имя аналитика**	DESKTOP-LVU7VOH\admin
Время отчета	29.09.2018 12:40:03	**Имя составителя отчета**	DESKTOP-LVU7VOH\admin
Последн. обновл. калиб.	27.09.2018 16:52	**Состояние серии**	Processed
Версия серии колич. анал	B.09.00	**Версия Quant Report**	B.09.00

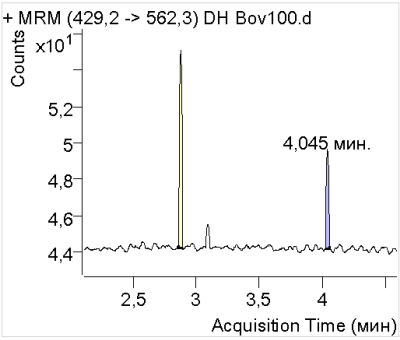
Время получ.	20.07.2018 15:37	**Файл данных**	DH Bov100.d
Тип пробы	Кал.	**Название пробы**	DH Bov100
Разбавление	1	**Метод сб. д**	N_peptide_main_gel.m

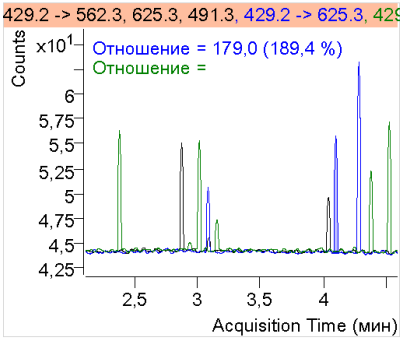
Хроматограмма пробы

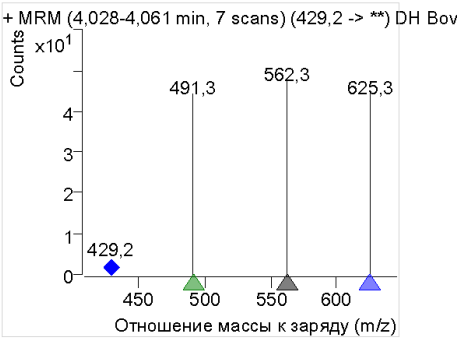


Соединение	Переход	ВУ	Откл.	Итоговая конц-я	Ед-цы
THVSEAVAQSTR.light	429.2 -> 562.3, 625.3, 491.3	4,045	21	ND	ng/ml
NDMAAQYK.light	470.7 -> 509.3, 711.3, 580.3	5,482	135535	105,7684	ng/ml
SNVSDAVAQSAR.light	602.8 -> 532.3	5,837	13413	98,1360	ng/ml
HPSDFGADAQAAMSK.light	511.6 -> 507.3, 641.3, 635.3	6,303	447623	98,6774	ng/ml
HPGDFGADAQGAMSK.light	496.9 -> 493.2	6,823	9215	6,9731	ng/ml
YLEFISDAIIHVLHAK.light	623.7 -> 796.9, 732.4, 602.3	9,308	797939	93,5609	ng/ml
YLEFISEAIIQVLQSK.light	627.7 -> 702.4	10,243	18	ND	ng/ml

THVSEAVAQSTR.light



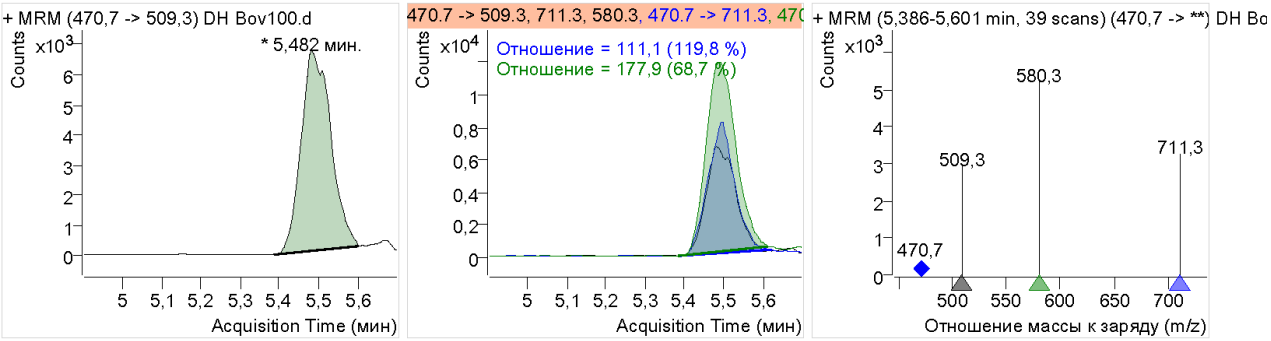




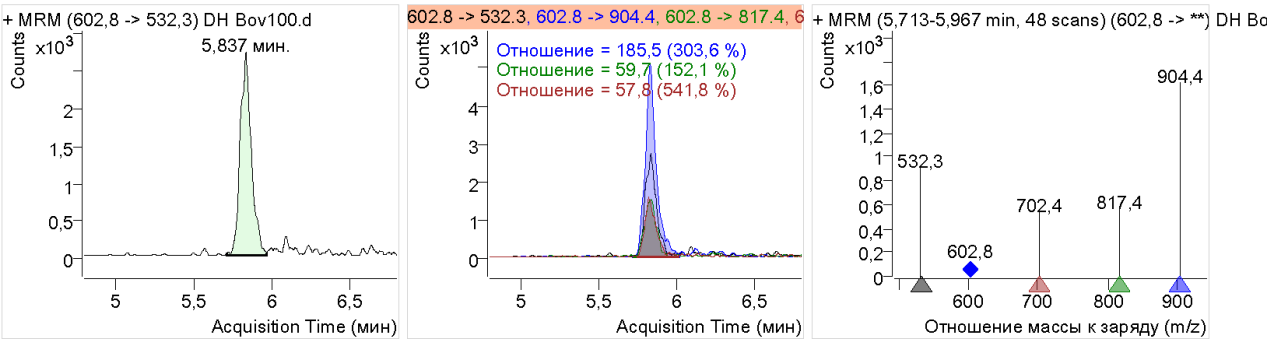
Полный отчет количественного анализа

Agilent Technologies

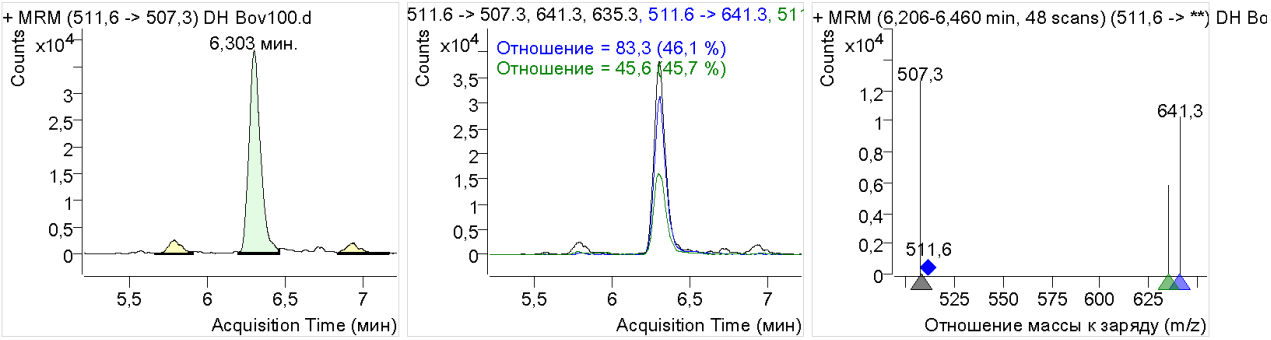
NDMAAQYK.light



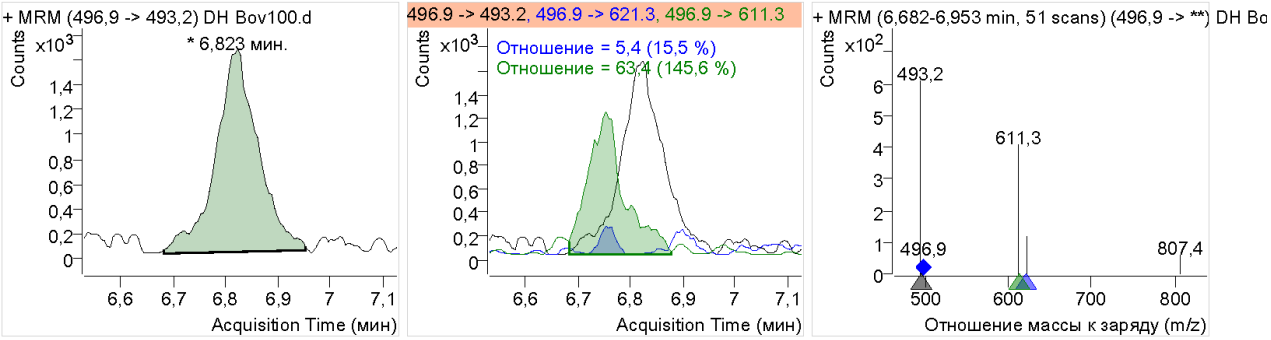
SNVSDAVAQSAR.light



HPSDFGADAQAAMSK.light



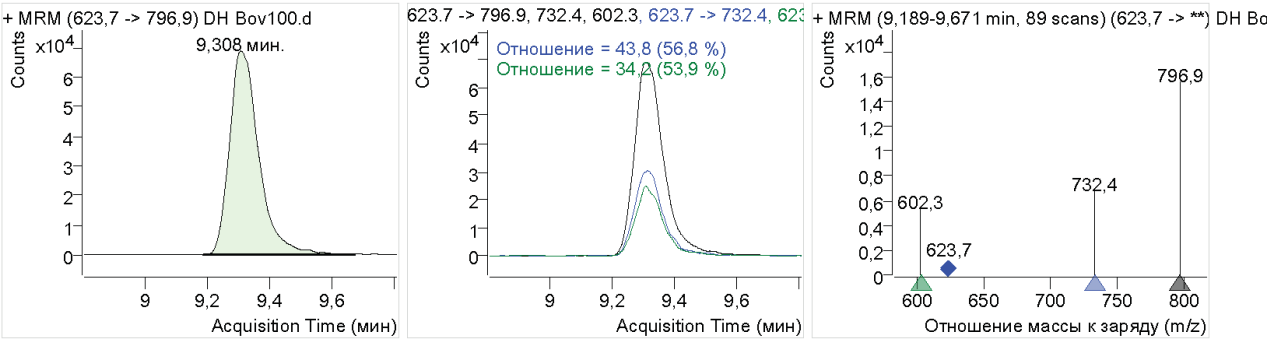
HPGDFGADAQGAMSK.light



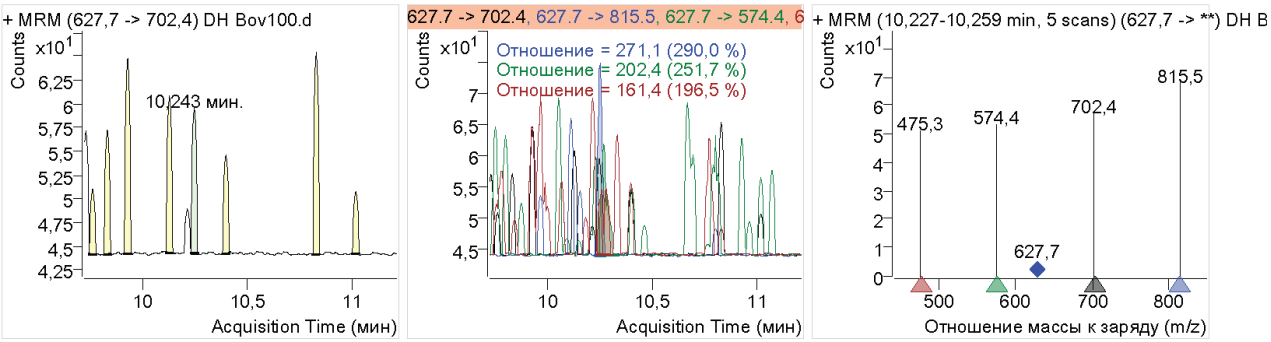
Полный отчет количественного анализа

Agilent Technologies

YLEFISDAIIHVLHAK.light



YLEFISEAIIQVLQSK.light



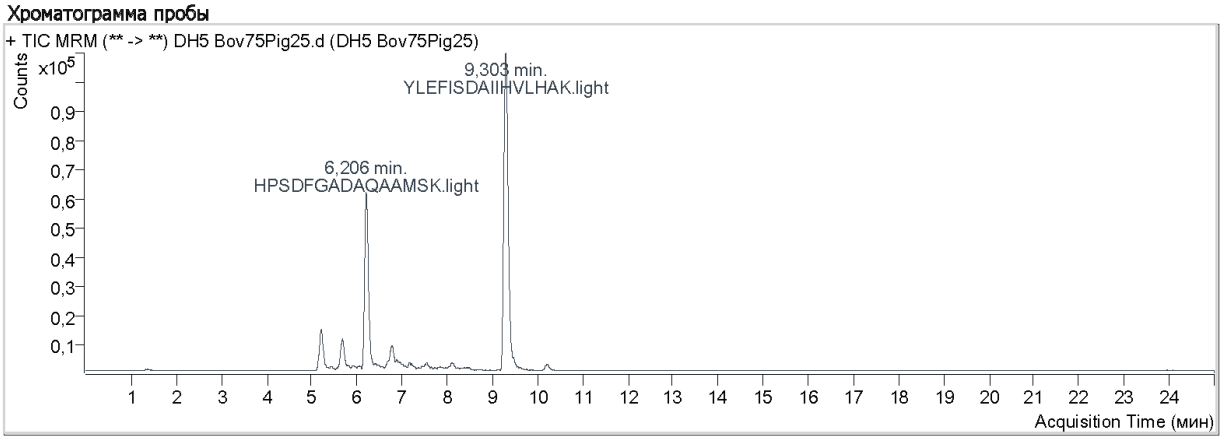
Полный отчет количественного анализа

Agilent Technologies

Папка серии	H:\Даниил\data\2018_07_20_DH\QuantResults\bovpigpept4.batch.bin		
Время анализа	27.09.2018 16:52	**Имя аналитика**	DESKTOP-LVU7VOH\admin
Время отчета	29.09.2018 12:40:05	**Имя составителя отчета**	DESKTOP-LVU7VOH\admin
Последн. обновл. калиб.	27.09.2018 16:52	**Состояние серии**	Processed
Версия серии колич. анал	B.09.00	**Версия Quant Report**	B.09.00

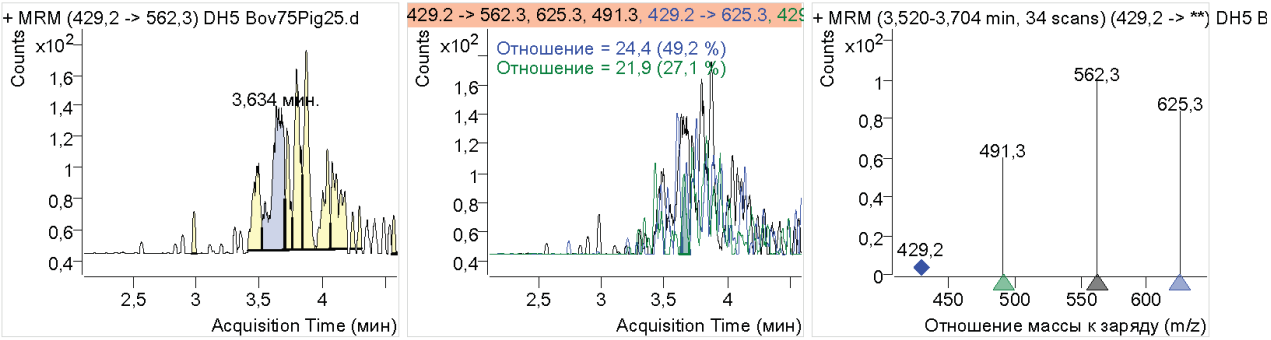
Время получ.	20.07.2018 16:02	**Файл данных**	DH5 Bov75Pig25.d
Тип пробы	Кал.	**Название пробы**	DH5 Bov75Pig25
Разбавление	1	**Метод сб. д**	N_peptide_main_gel.m

Хроматограмма пробы



Соединение	Переход	ВУ	Откл.	Итоговая конц-я	Ед-цы
THVSEAVAQSTR.light	429.2 -> 562.3, 625.3, 491.3	3,634	863	25,8920	ng/ml
NDMAAQYK.light	470.7 -> 509.3, 711.3, 580.3	5,201	85895	68,0176	ng/ml
SNVSDAVAQSAR.light	602.8 -> 532.3	5,691	10450	75,7717	ng/ml
HPSDFGADAQAAMSK.light	511.6 -> 507.3, 641.3, 635.3	6,206	344559	75,6194	ng/ml
HPGDFGADAQGAMSK.light	496.9 -> 493.2	6,785	11505	20,5787	ng/ml
YLEFISDAIIHVLHAK.light	623.7 -> 796.9, 732.4, 602.3	9,303	677748	79,0392	ng/ml
YLEFISEAIIQVLQSK.light	627.7 -> 702.4	10,173	4095	25,5731	ng/ml

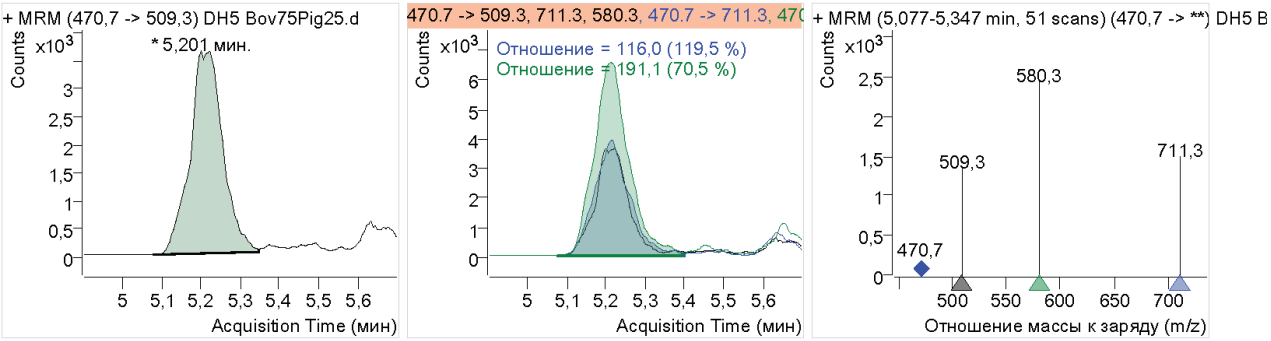
THVSEAVAQSTR.light



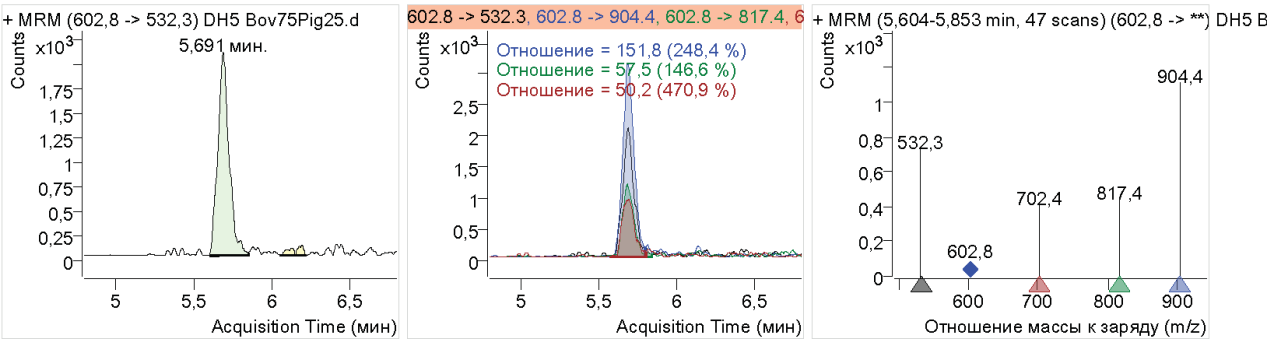
Полный отчет количественного анализа

Agilent Technologies

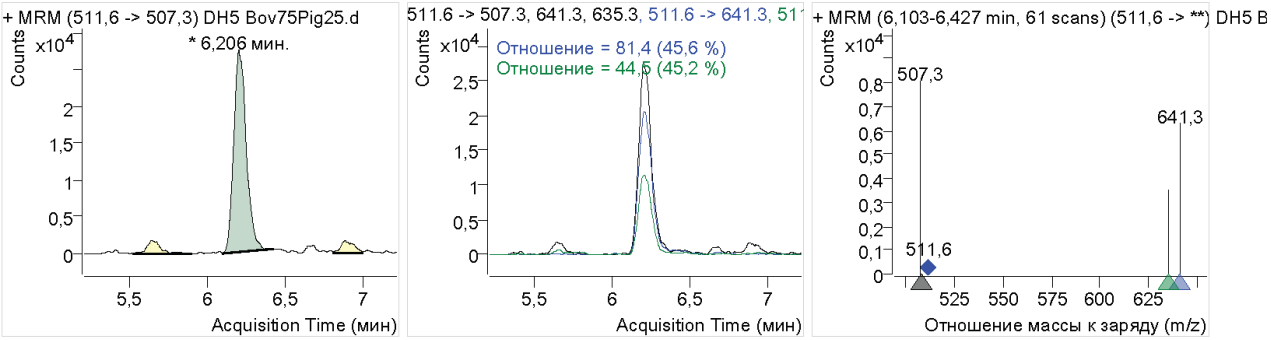
NDMAAQYK.light



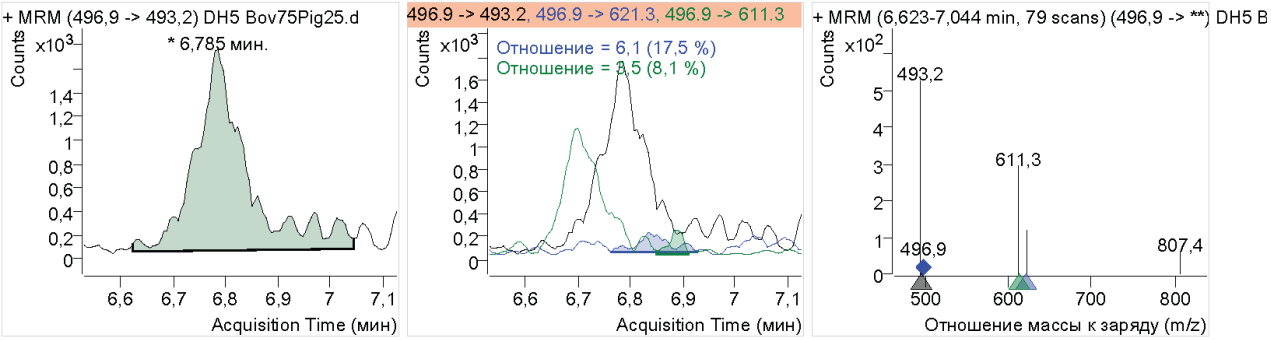
SNVSDAVAQSAR.light



HPSDFGADAQAAMSK.light



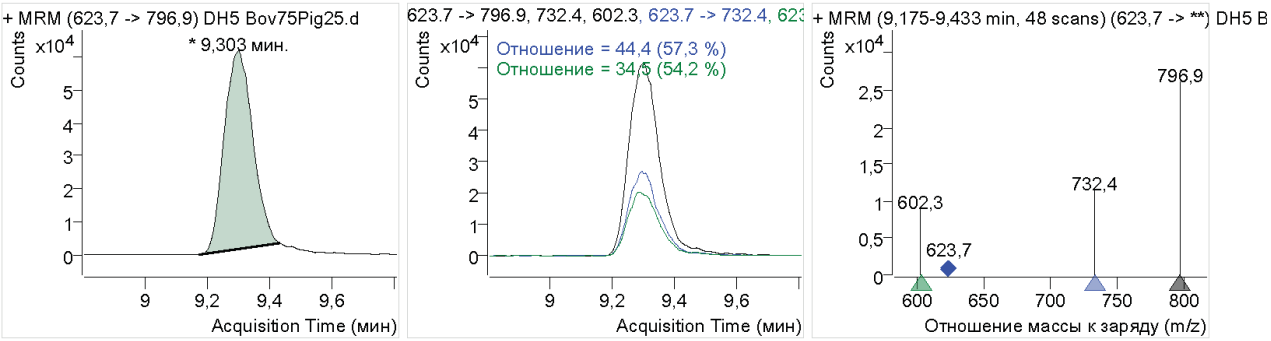
HPGDFGADAQGAMSK.light



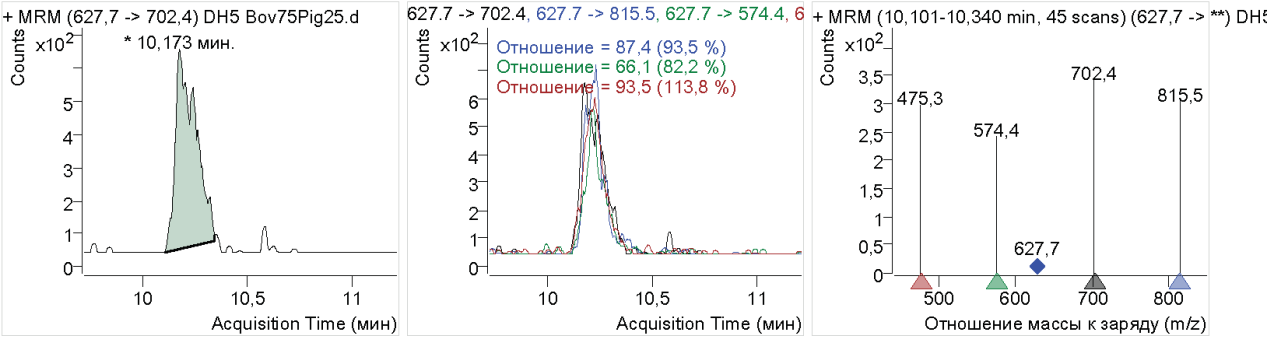
Полный отчет количественного анализа

Agilent Technologies

YLEFISDAIIHVLHAK.light



YLEFISEAIIQVLQSK.light



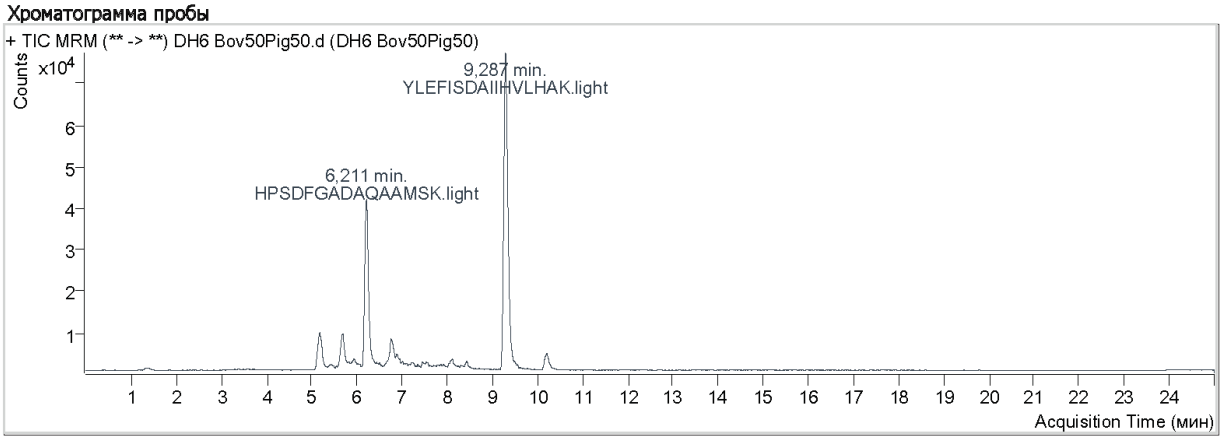
Полный отчет количественного анализа

Agilent Technologies

Папка серии	H:\Даниил\data\2018_07_20_DH\QuantResults\bovpigpept4.batch.bin		
Время анализа	27.09.2018 16:52	**Имя аналитика**	DESKTOP-LVU7VOH\admin
Время отчета	29.09.2018 12:40:05	**Имя составителя отчета**	DESKTOP-LVU7VOH\admin
Последн. обновл. калиб.	27.09.2018 16:52	**Состояние серии**	Processed
Версия серии колич. анал	B.09.00	**Версия Quant Report**	B.09.00

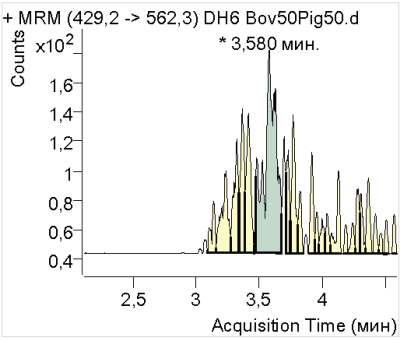
Время получ.	20.07.2018 16:28	**Файл данных**	DH6 Bov50Pig50.d
Тип пробы	Кал.	**Название пробы**	DH6 Bov50Pig50
Разбавление	1	**Метод сб. д**	N_peptide_main_gel.m

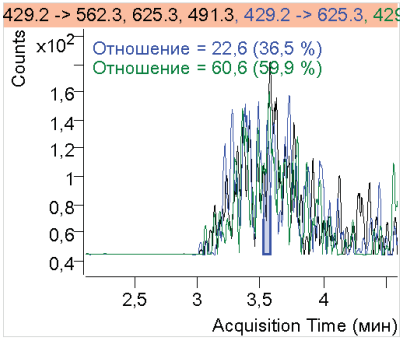
Хроматограмма пробы

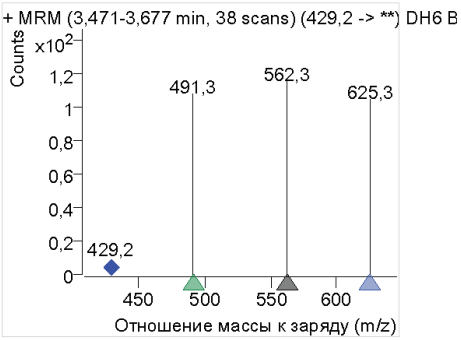


Соединение	Переход	ВУ	Откл.	Итоговая конц-я	Ед-цы
THVSEAVAQSTR.light	429.2 -> 562.3, 625.3, 491.3	3,580	1594	48,6802	ng/ml
NDMAAQYK.light	470.7 -> 509.3, 711.3, 580.3	5,169	60809	48,9401	ng/ml
SNVSDAVAQSAR.light	602.8 -> 532.3	5,691	7271	51,7719	ng/ml
HPSDFGADAQAAMSK.light	511.6 -> 507.3, 641.3, 635.3	6,211	232911	50,6407	ng/ml
HPGDFGADAQGAMSK.light	496.9 -> 493.2	6,758	15627	45,0592	ng/ml
YLEFISDAIIHVLHAK.light	623.7 -> 796.9, 732.4, 602.3	9,287	491217	56,5023	ng/ml
YLEFISEAIIQVLQSK.light	627.7 -> 702.4	10,200	7779	49,0032	ng/ml

THVSEAVAQSTR.light



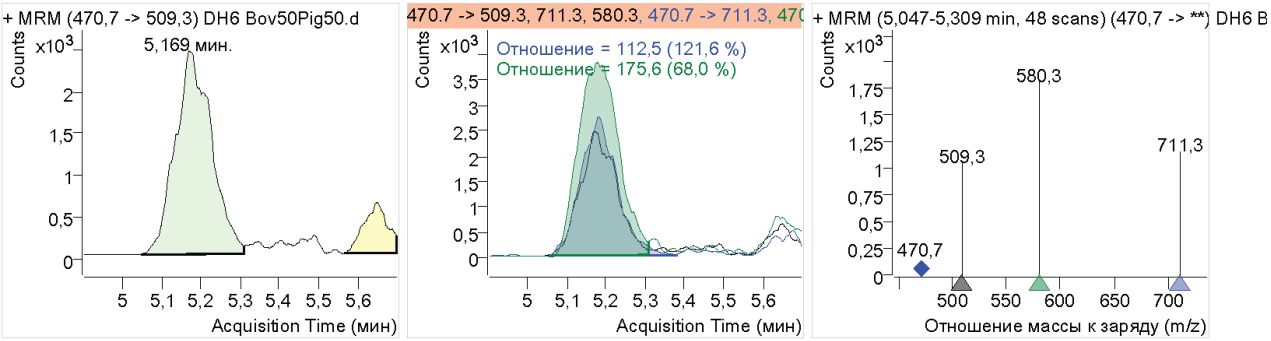




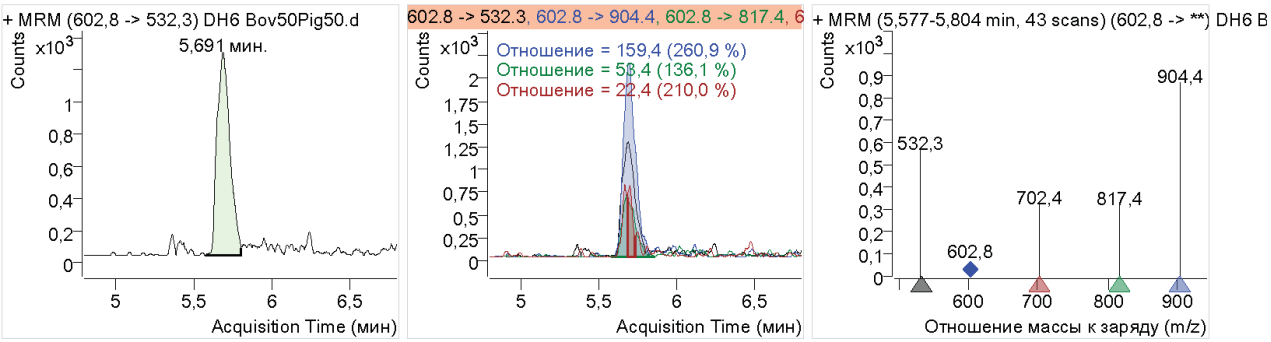
Полный отчет количественного анализа

Agilent Technologies

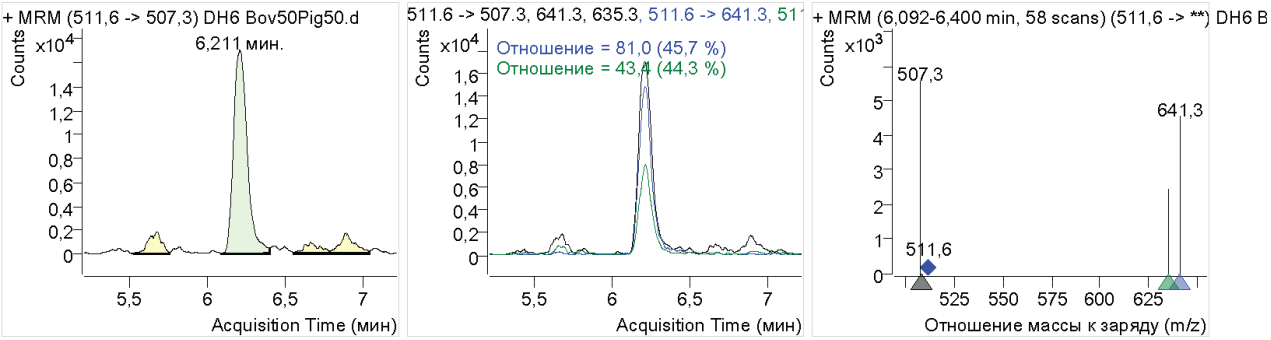
NDMAAQYK.light



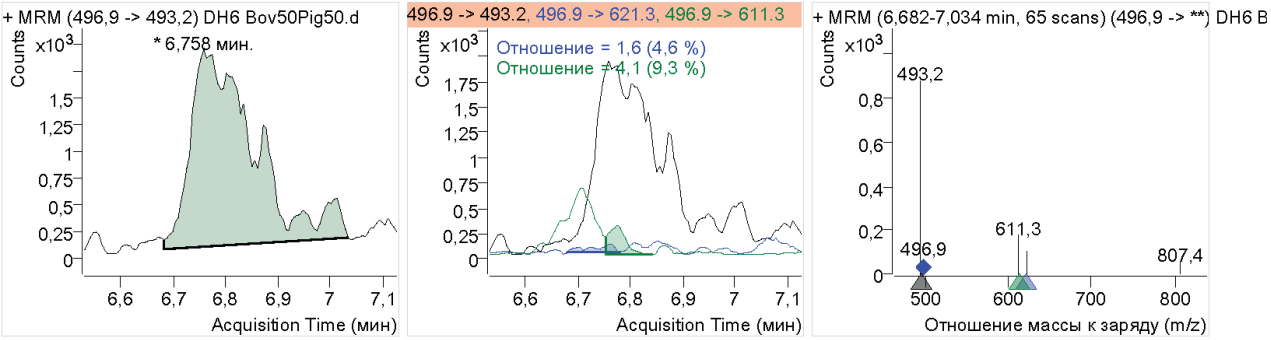
SNVSDAVAQSAR.light



HPSDFGADAQAAMSK.light



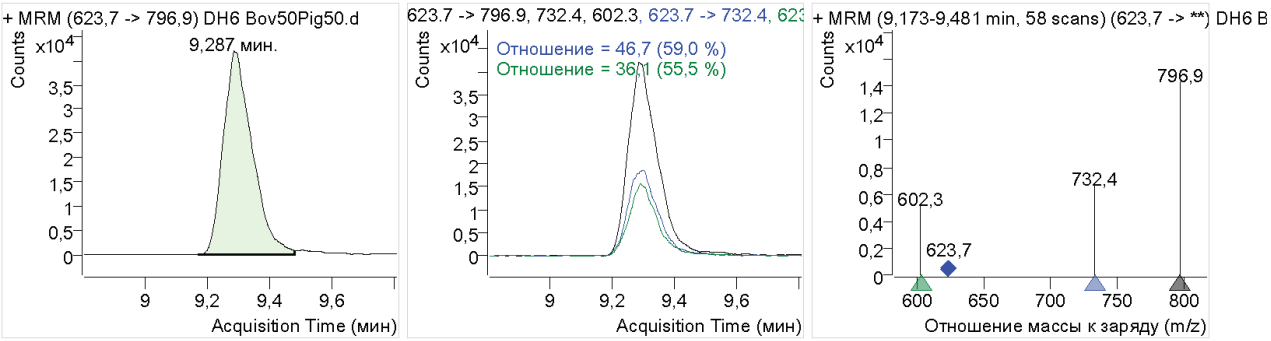
HPGDFGADAQGAMSK.light



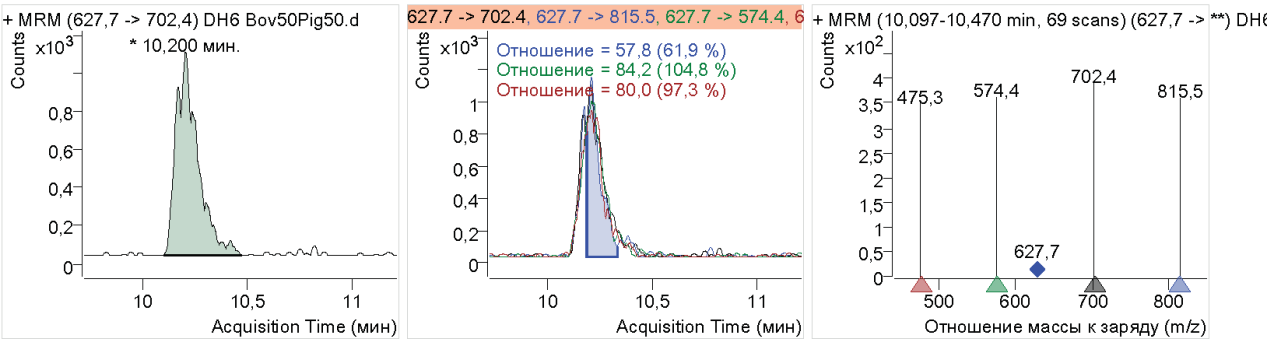
Полный отчет количественного анализа

Agilent Technologies

YLEFISDAIIHVLHAK.light



YLEFISEAIIQVLQSK.light



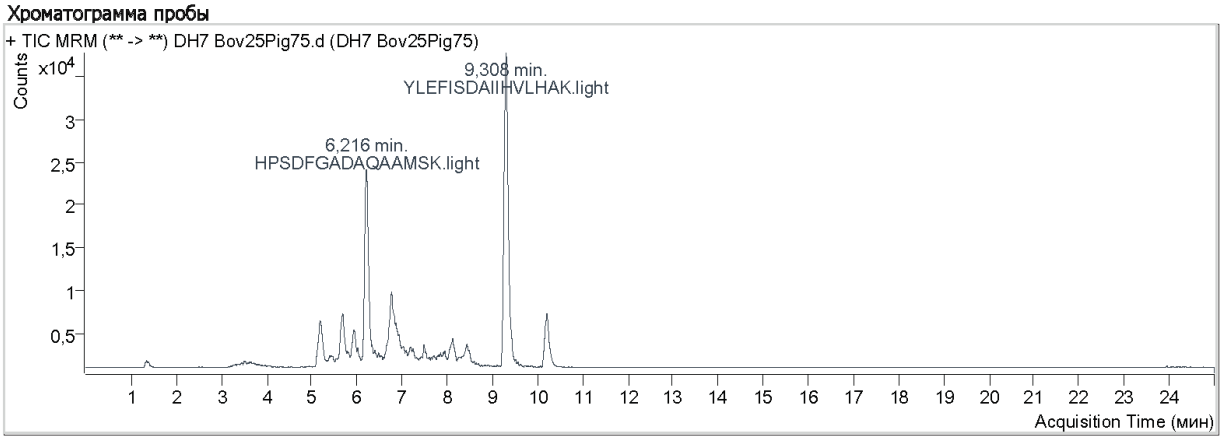
Полный отчет количественного анализа

Agilent Technologies

Папка серии	H:\Даниил\data\2018_07_20_DH\QuantResults\bovpigpept4.batch.bin		
Время анализа	27.09.2018 16:52	**Имя аналитика**	DESKTOP-LVU7VOH\admin
Время отчета	29.09.2018 12:40:06	**Имя составителя отчета**	DESKTOP-LVU7VOH\admin
Последн. обновл. калиб.	27.09.2018 16:52	**Состояние серии**	Processed
Версия серии колич. анал	B.09.00	**Версия Quant Report**	B.09.00

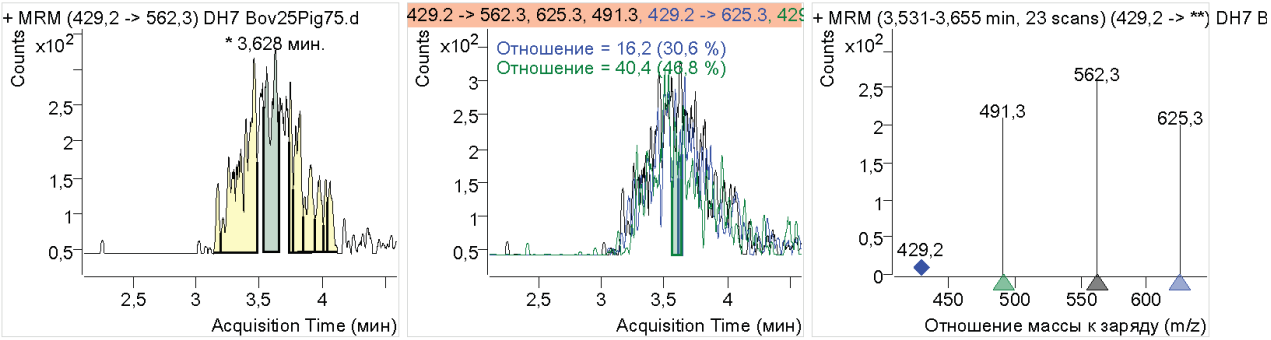
Время получ.	20.07.2018 16:54	**Файл данных**	DH7 Bov25Pig75.d
Тип пробы	Кал.	**Название пробы**	DH7 Bov25Pig75
Разбавление	1	**Метод сб. д**	N_peptide_main_gel.m

Хроматограмма пробы



Соединение	Переход	ВУ	Откл.	Итоговая конц-я	Ед-цы
THVSEAVAQSTR.light	429.2 -> 562.3, 625.3, 491.3	3,628	2483	76,4027	ng/ml
NDMAAQYK.light	470.7 -> 509.3, 711.3, 580.3	5,196	29481	25,1155	ng/ml
SNVSDAVAQSAR.light	602.8 -> 532.3	5,718	3924	26,5175	ng/ml
HPSDFGADAQAAMSK.light	511.6 -> 507.3, 641.3, 635.3	6,216	128917	27,3747	ng/ml
HPGDFGADAQGAMSK.light	496.9 -> 493.2	6,828	19568	68,4690	ng/ml
YLEFISDAIIHVLHAK.light	623.7 -> 796.9, 732.4, 602.3	9,308	239770	26,1219	ng/ml
YLEFISEAIIQVLQSK.light	627.7 -> 702.4	10,216	12169	76,9162	ng/ml

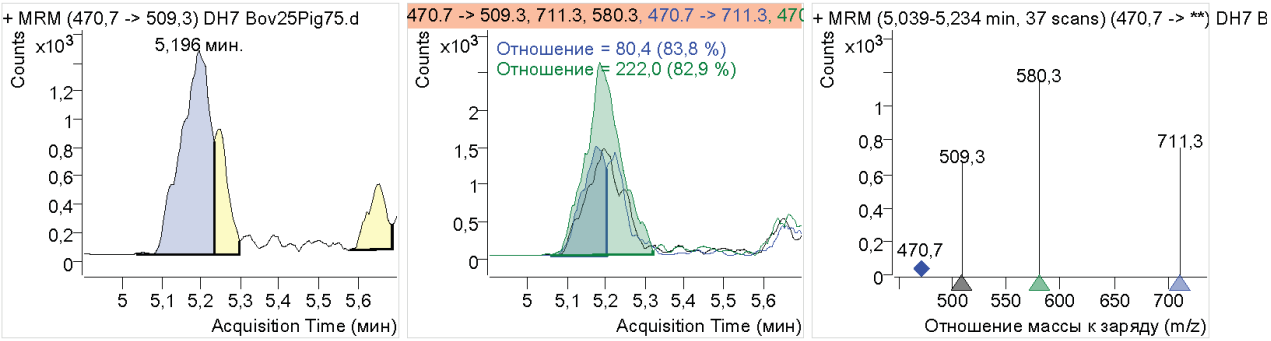
THVSEAVAQSTR.light



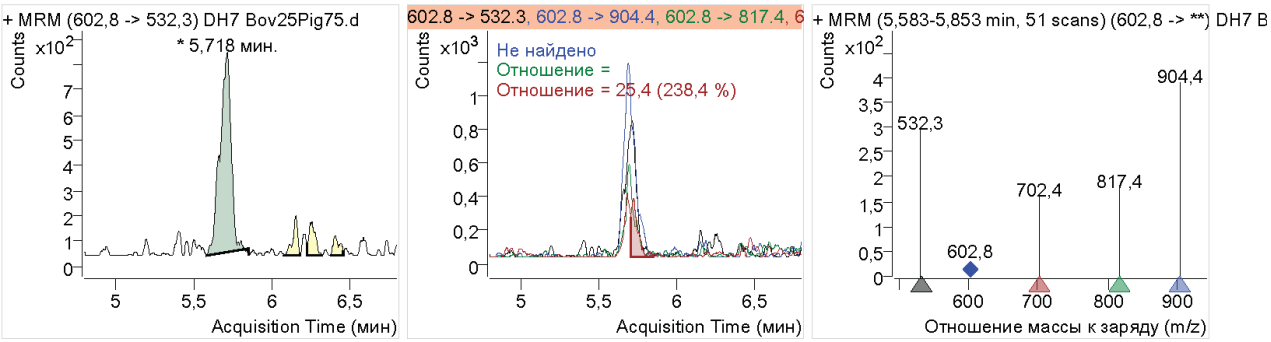
Полный отчет количественного анализа

Agilent Technologies

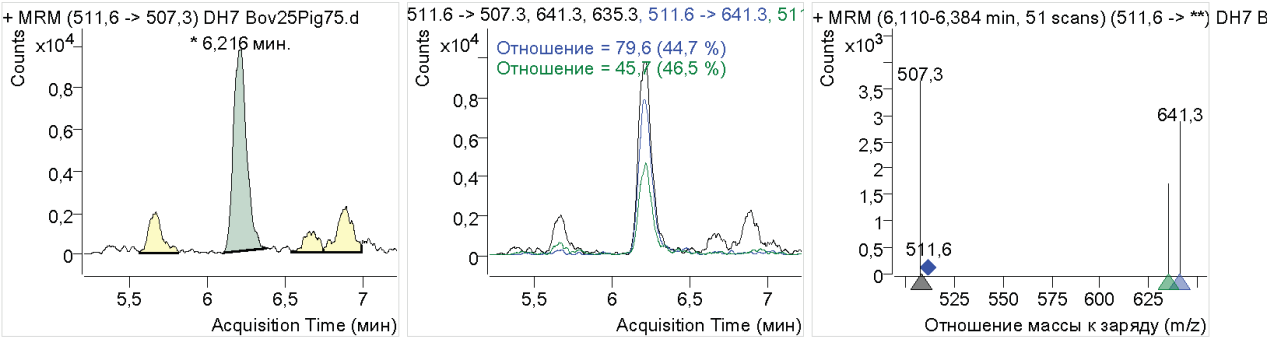
NDMAAQYK.light



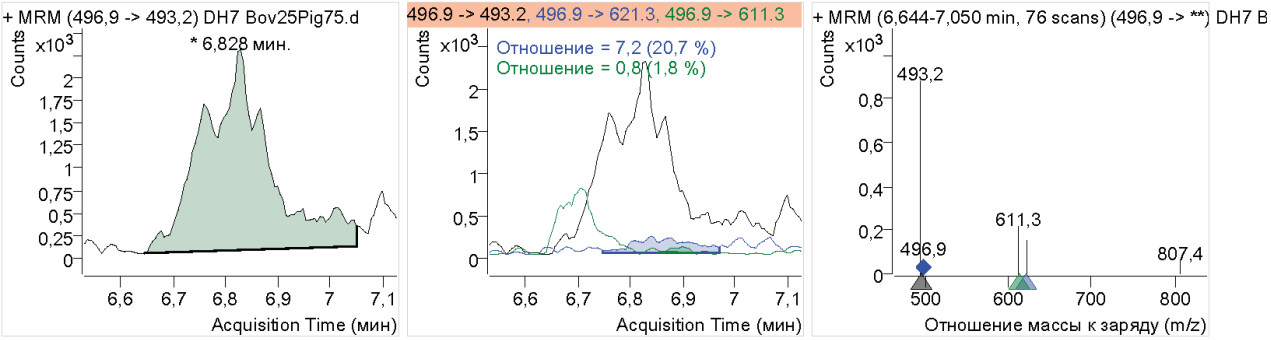
SNVSDAVAQSAR.light



HPSDFGADAQAAMSK.light



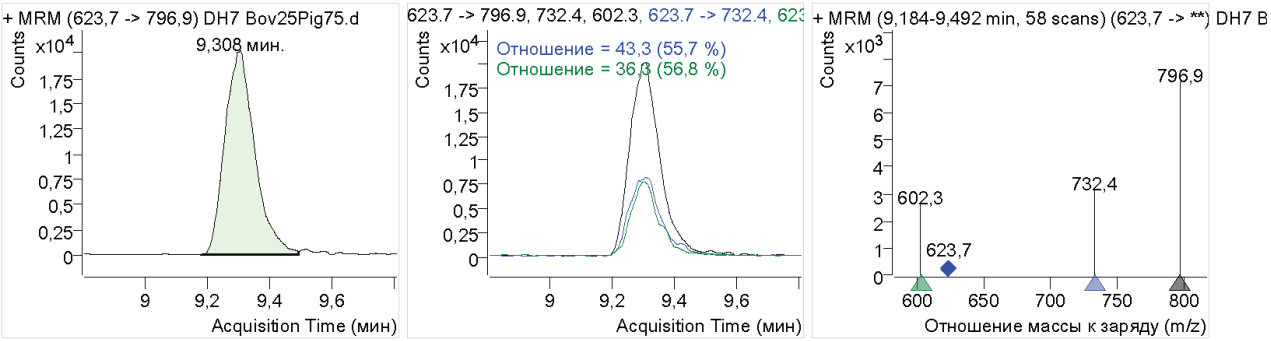
HPGDFGADAQGAMSK.light



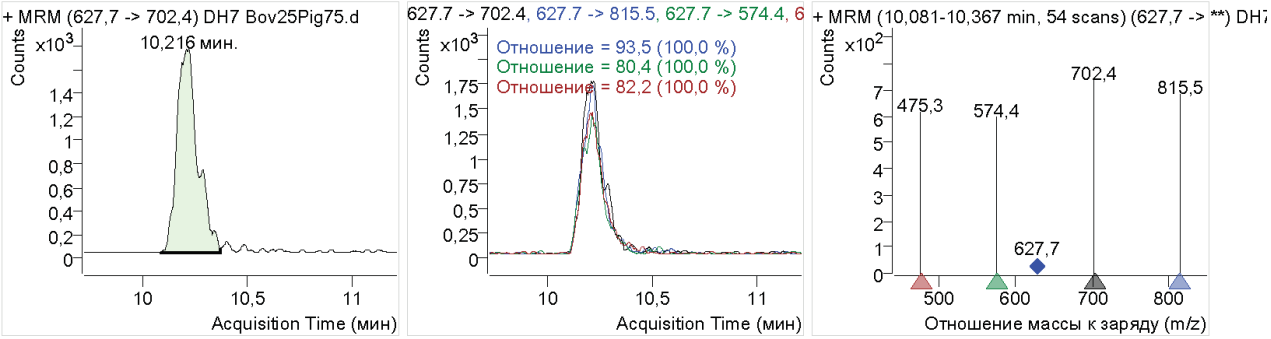
Полный отчет количественного анализа

Agilent Technologies

YLEFISDAIIHVLHAK.light



YLEFISEAIIQVLQSK.light



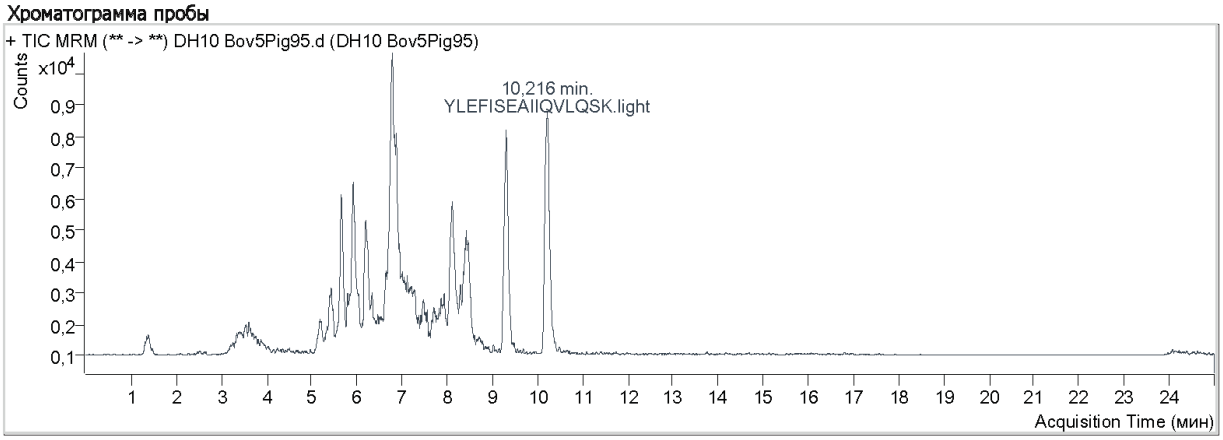
Полный отчет количественного анализа

Agilent Technologies

Папка серии	H:\Даниил\data\2018_07_20_DH\QuantResults\bovpigpept4.batch.bin		
Время анализа	27.09.2018 16:52	**Имя аналитика**	DESKTOP-LVU7VOH\admin
Время отчета	29.09.2018 12:40:06	**Имя составителя отчета**	DESKTOP-LVU7VOH\admin
Последн. обновл. калиб.	27.09.2018 16:52	**Состояние серии**	Processed
Версия серии колич. анал	B.09.00	**Версия Quant Report**	B.09.00

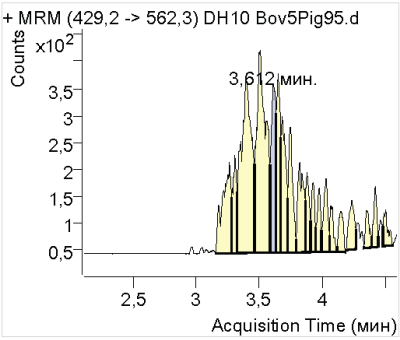
Время получ.	20.07.2018 17:20	**Файл данных**	DH10 Bov5Pig95.d
Тип пробы	Кал.	**Название пробы**	DH10 Bov5Pig95
Разбавление	1	**Метод сб. д**	N_peptide_main_gel.m

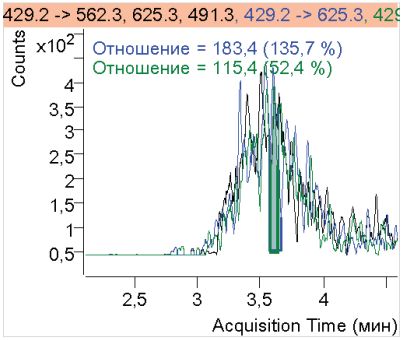
Хроматограмма пробы

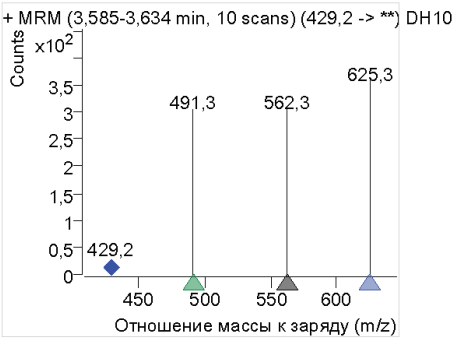


Соединение	Переход	ВУ	Откл.	Итоговая конц-я	Ед-цы
THVSEAVAQSTR.light	429.2 -> 562.3, 625.3, 491.3	3,612	3084	95,1591	ng/ml
NDMAAQYK.light	470.7 -> 509.3, 711.3, 580.3	5,201	2229	4,3906	ng/ml
SNVSDAVAQSAR.light	602.8 -> 532.3	5,658	1126	5,3975	ng/ml
HPSDFGADAQAAMSK.light	511.6 -> 507.3, 641.3, 635.3	6,195	23909	3,8816	ng/ml
HPGDFGADAQGAMSK.light	496.9 -> 493.2	6,828	25537	103,9200	ng/ml
YLEFISDAIIHVLHAK.light	623.7 -> 796.9, 732.4, 602.3	9,308	44763	2,5608	ng/ml
YLEFISEAIIQVLQSK.light	627.7 -> 702.4	10,216	14834	93,8610	ng/ml

THVSEAVAQSTR.light



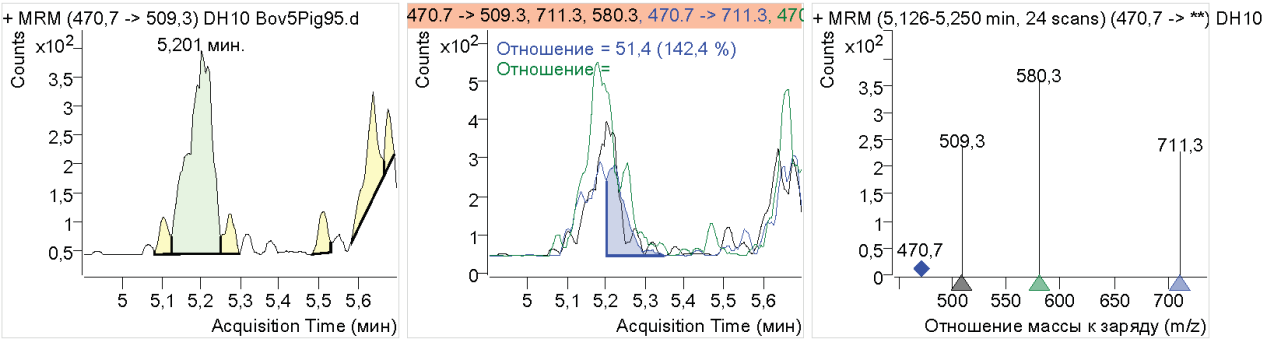




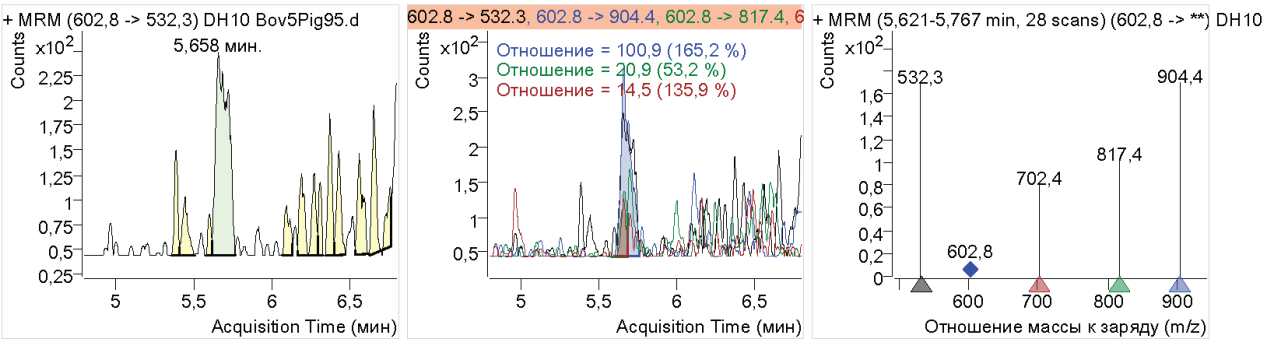
Полный отчет количественного анализа

Agilent Technologies

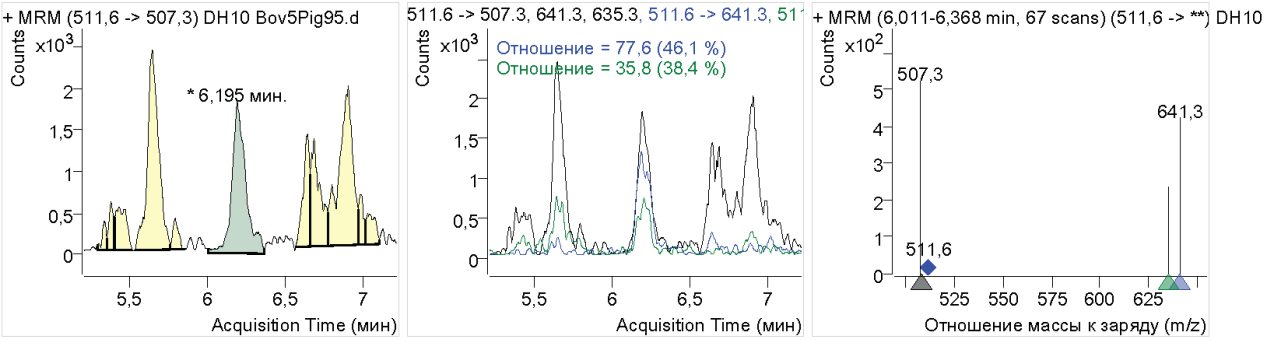
NDMAAQYK.light



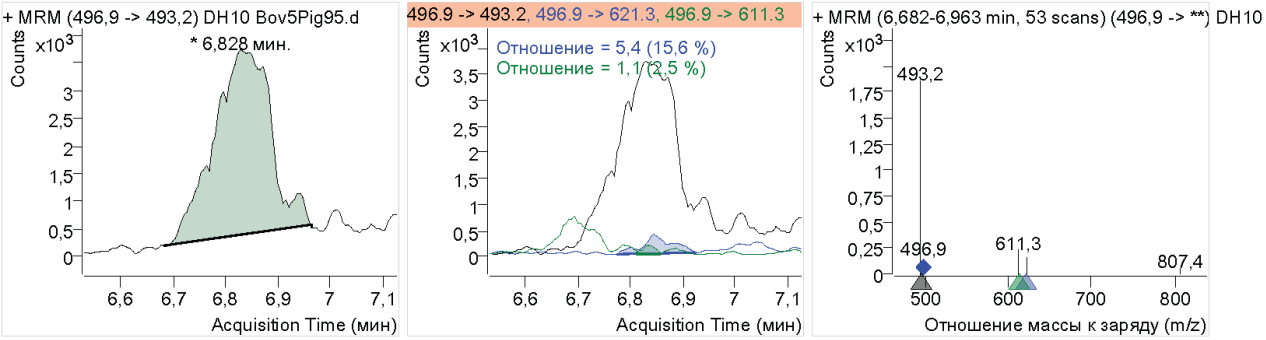
SNVSDAVAQSAR.light



HPSDFGADAQAAMSK.light



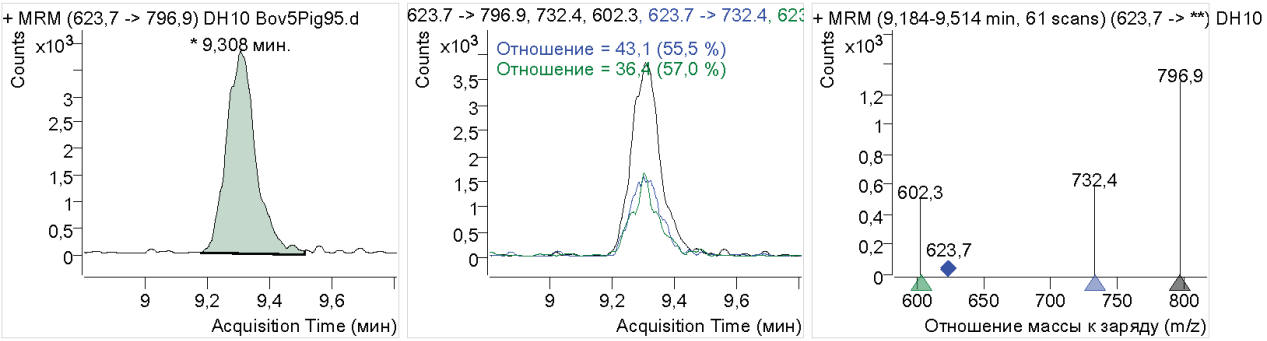
HPGDFGADAQGAMSK.light



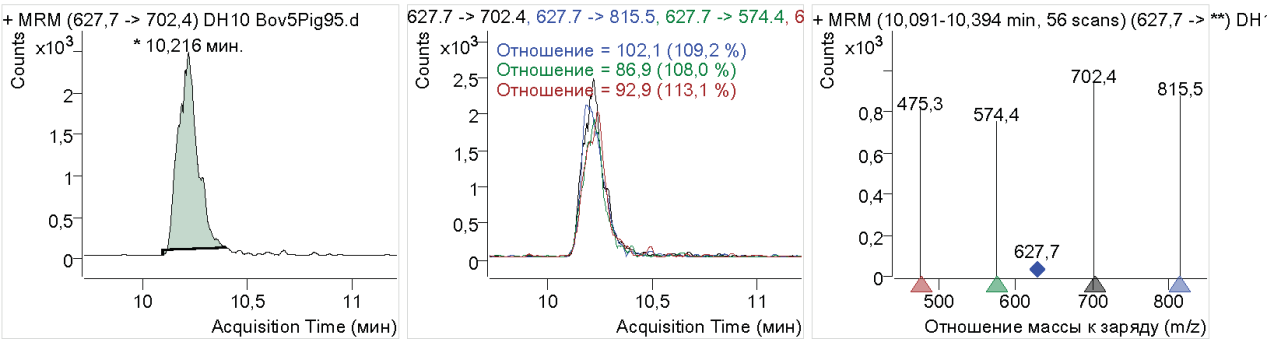
Полный отчет количественного анализа

Agilent Technologies

YLEFISDAIIHVLHAK.light



YLEFISEAIIQVLQSK.light



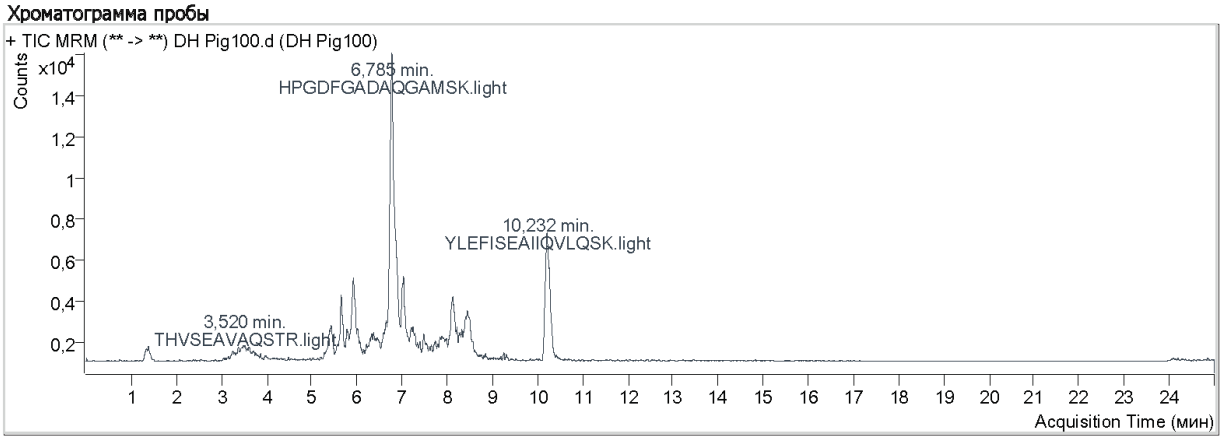
Полный отчет количественного анализа

Agilent Technologies

Папка серии	H:\Даниил\data\2018_07_20_DH\QuantResults\bovpigpept4.batch.bin		
Время анализа	27.09.2018 16:52	**Имя аналитика**	DESKTOP-LVU7VOH\admin
Время отчета	29.09.2018 12:40:07	**Имя составителя отчета**	DESKTOP-LVU7VOH\admin
Последн. обновл. калиб.	27.09.2018 16:52	**Состояние серии**	Processed
Версия серии колич. анал	B.09.00	**Версия Quant Report**	B.09.00

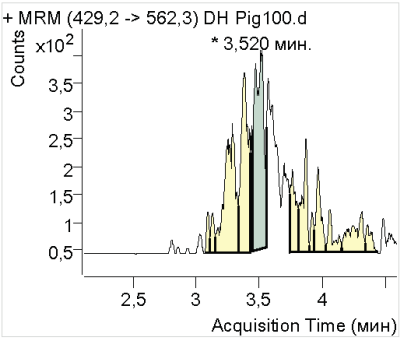
Время получ.	20.07.2018 17:45	**Файл данных**	DH Pig100.d
Тип пробы	Кал.	**Название пробы**	DH Pig100
Разбавление	1	**Метод сб. д**	N_peptide_main_gel.m

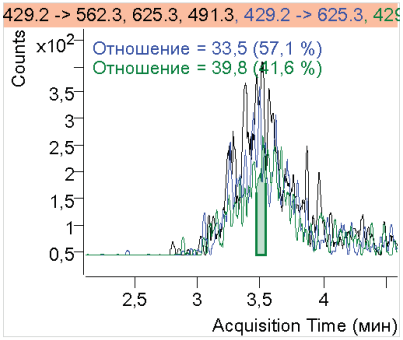
Хроматограмма пробы

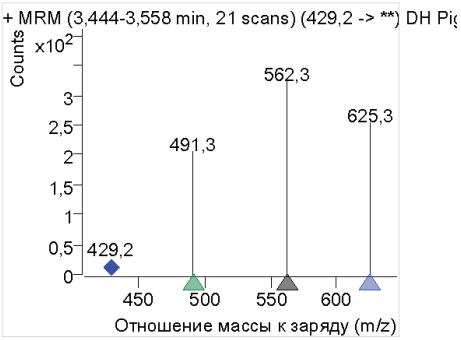


Соединение	Переход	ВУ	Откл.	Итоговая конц-я	Ед-цы
THVSEAVAQSTR.light	429.2 -> 562.3, 625.3, 491.3	3,520	3215	99,2338	ng/ml
NDMAAQYK.light	470.7 -> 509.3, 711.3, 580.3	5,336	95	2,7678	ng/ml
SNVSDAVAQSAR.light	602.8 -> 532.3	5,886	67	ND	ng/ml
HPSDFGADAQAAMSK.light	511.6 -> 507.3, 641.3, 635.3	6,211	1224	ND	ng/ml
HPGDFGADAQGAMSK.light	496.9 -> 493.2	6,785	65920	343,7849	ng/ml
YLEFISDAIIHVLHAK.light	623.7 -> 796.9, 732.4, 602.3	9,308	517	ND	ng/ml
YLEFISEAIIQVLQSK.light	627.7 -> 702.4	10,232	13410	84,8087	ng/ml

THVSEAVAQSTR.light



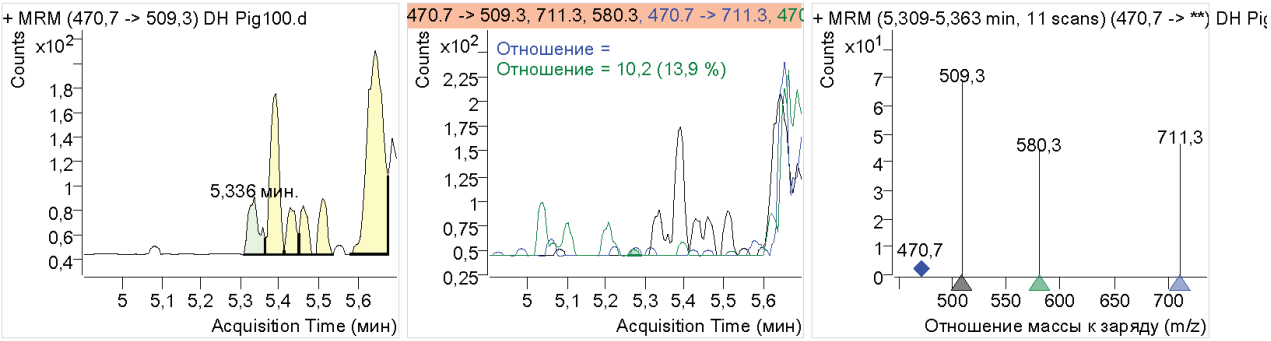




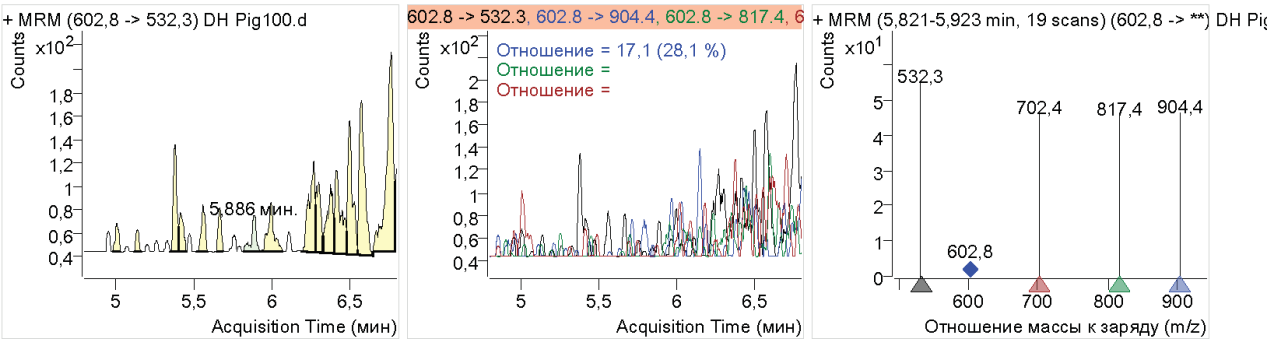
Полный отчет количественного анализа

Agilent Technologies

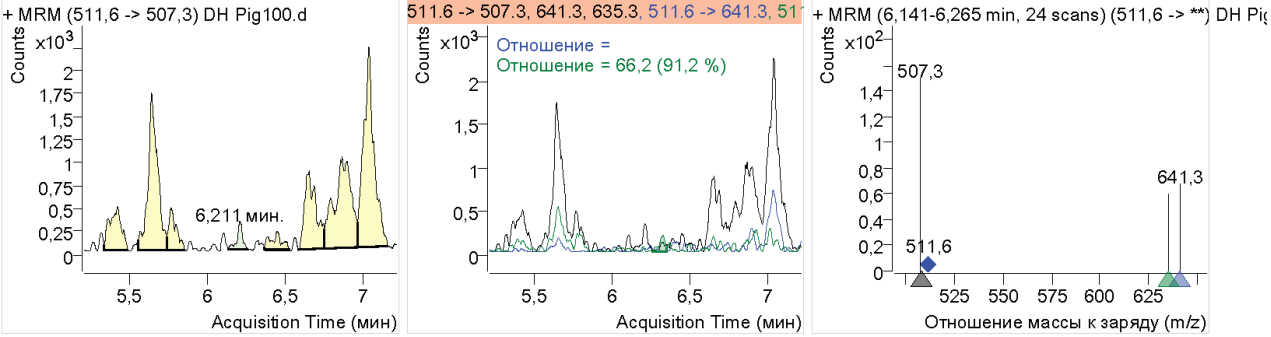
NDMAAQYK.light



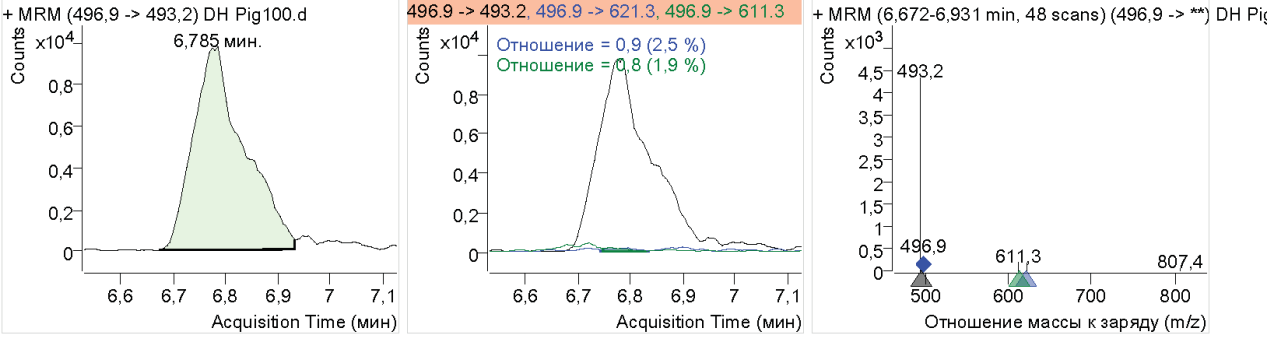
SNVSDAVAQSAR.light



HPSDFGADAQAAMSK.light



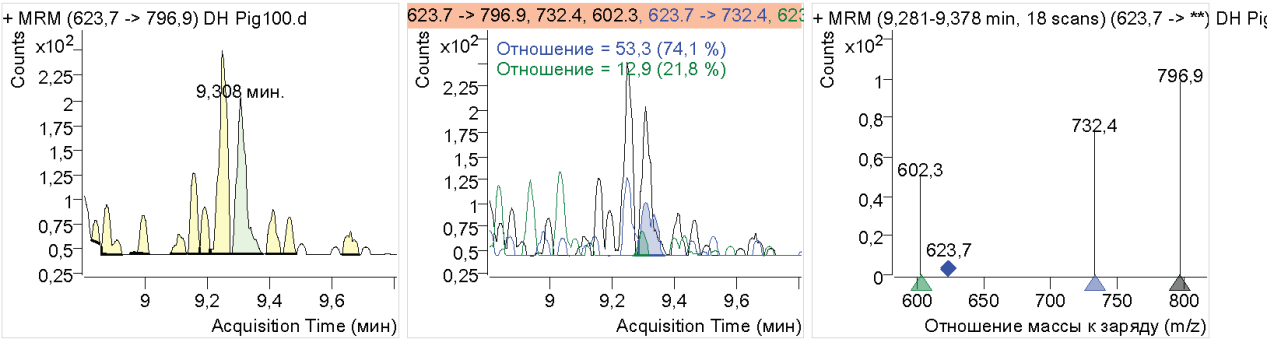
HPGDFGADAQGAMSK.light



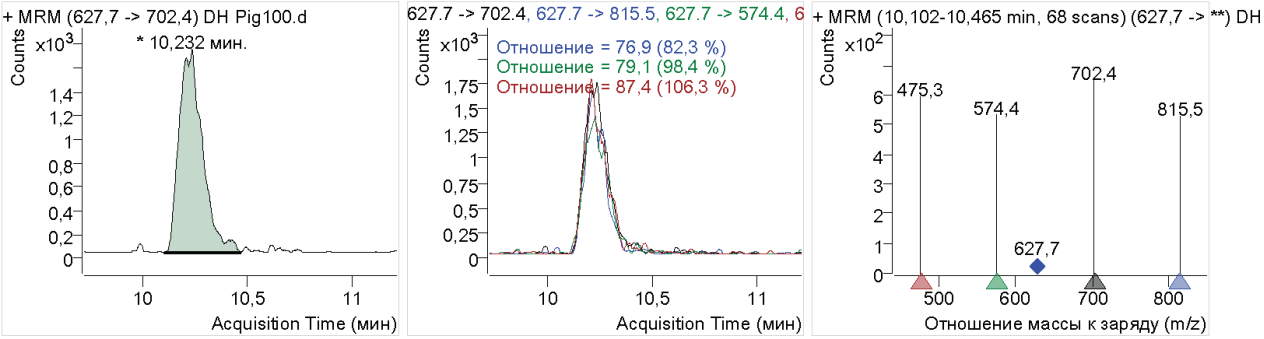
Полный отчет количественного анализа

Agilent Technologies

YLEFISDAIIHVLHAK.light



YLEFISEAIIQVLQSK.light



Приложение Г

РАСЧЕТ ЭКОНОМИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ

использования методики измерений «идентификационный анализ протеотипических пептидов для мясного сырья методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием»

Данная статья содержит в себе затраты на приобретение, изготовление либо аренду инструментов, аппаратов, контрольно-измерительных приборов и прочих специальных устройств, необходимых для проведения исследований.

В данном случае химическая посуда и оборудование для исследований не приобретались специально, а были арендованы на время работы.

Таблица 1 – Расчет стоимости химических реактивов при анализе протеотипических пептидов разработанным проектом методики измерений «Идентификационный анализ протеотипических пептидов для мясного сырья методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием»

Материалы (реактивы)	Объем	Стоимость, руб.	Количество реактива, на 1 анализ	Сумма, руб.
Натрий дезоксихолат, не менее 98,5%, BioChemica	100г	9000,00	0,05г	4,50
Бикарбонат аммония	1000г	1000,00	0,04г	0,10
DL-дитиотреитол	5г	2000,10	0,03мг	0,10
Йодацетамид (кристаллический)	5г	3466,00	0,06мг	0,10
Sequencing Grade Modified Trypsin, Porcine (lyophilized)	100мкг	6000,00	5,00мкг	300,00
Пробирки и наконечники	1000мкл	3,00	15ед	45,00
Виала со вставкой	2мл	34,00	1ед	34,00
Колонка аналитическая	1000мкл	60000,00	1ед	60,00
Фильтры Amicon, 3 kDa, 1,5 ml	96ед	49250,34	1ед	513,02
Набор Qubit Protein Assay Kit, для количественного определения белков (0,25-5,0 мкг), 100 реакций, Thermo FS	100ед	16539,00	1ед	165,39
			ИТОГО:	**1122,21**

Таблица 2 – Расчет стоимости оборудования для анализов

Наименование оборудования и приборов	Количество единиц	Стоимость, руб.
Системы ЖХ-МС-МС Agilent 6410B	1	10 000 000,00
Флуориметр, 2 канала: 430-495/510-580 и 600-645/665-720 нм, 1x0,5 мл, Qubit 4	1	400 000,00
Весы аналитические (ц.д.0,0001г)	1	44 000,00
Персональный компьютер	1	25 000,00
Шкаф вытяжной химический	1	55 300,00
Баня водяная лабораторная	1	45 212,00
Холодильник бытовой электрический	1	14 000,00
Дозаторы пипеточные	2	12 300,00
Электромясорубка	1	3 500,00
	ИТОГО:	**10 599 312,00**

Арендная плата за использование специального оборудования рассчитывалась исходя из стоимости оборудования, 15% амортизации и срока аренды – 1 месяц.

Арендная плата = [(10 599 312,00·0,15)/12]·1 = 132491,40 р.

<u>На один анализ:</u>

Арендная плата за использование специального оборудования рассчитывалась исходя из количества дней в месяце (30) и количества анализов (по 25 минут) в сутки (15) с учетом одного дня на подготовку образцов.

Арендная плата = [(132491,40 /30]/15 = 294,43 р.

Таблица 3 – Суммарные затраты на проведение аналитических исследований «Определение содержания полициклических ароматических углеводородов методом тандемной жидкостной хромато-масс-спектрометрии»

№ п/п	Статьи затрат	Сумма, руб.
1	Стоимость химических реактивов на 1 анализ	1122,21
2	Арендная плата за использование специального оборудования на 1 анализ	294,43
	ИТОГО:	**1416,64**