

基于 MALDI-TOF MS 肽指纹图谱技术的 中药鹿血晶掺伪鉴别研究

王慎兴^{1,2}, 曹玲³, 黄青², 马聪玉⁴, 潘建斌⁵,
赵浩东², 施海蔚², 狄斌¹, 陈洪渊⁵

(1. 中国药科大学药学院, 江苏 南京 211112; 2. 江苏省食品药品监督检验研究院, 江苏 南京 210019;
3. 江苏省药品监督管理局审核查验中心, 江苏 南京 210019; 4. 中国医学科学院药物研究所, 北京 100050;
5. 南京大学化学化工学院, 江苏 南京 210046)

摘要: 本研究应用基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术, 构建了具有物种特异性的白蛋白和血红蛋白特征肽指纹图谱, 用于中药鹿血晶的掺伪鉴别。以鹿血晶真品(梅花鹿、马鹿)和常见掺伪品(猪、牛、羊、驴)共 6 个物种的血晶制品作为研究对象, 通过理论肽段预测并结合高分辨质谱, 筛选出 1 组能够反映物种差异的特征肽段。采集不同物种来源血晶制品以及不同来源市售中药鹿血晶的特征肽指纹图谱, 并结合化学计量学分析, 实现了不同来源血晶制品的快速准确区分。该方法能够实现复杂基质样品中目标特征肽段的灵敏、特异检测, 具有高专属性、快速、便捷的优势, 为鹿血晶及血晶类中药制品的掺伪鉴别提供了准确的分析手段, 也为其他复杂蛋白类制品的快速鉴别提供了有价值的参考。

关键词: 基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF MS); 中药鹿血晶; 肽指纹图谱; 掺伪鉴别

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2025)01-0115-08

DOI: 10.7538/zpxb.2024.0053

CSTR: 32365.14.zpxb.2024.0053

Identification of Adulterated Deer Blood Crystals in Traditional Chinese Medicine Based on MALDI-TOF MS Peptide Fingerprints Technique

WANG Shen-xing^{1,2}, CAO Ling³, HUANG Qing², MA Cong-yu⁴, PAN Jian-bin⁵,
ZHAO Hao-dong², SHI Hai-wei², DI Bin¹, CHEN Hong-yuan⁵

(1. School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211112, China; 2. Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210019, China; 3. Jiangsu Provincial Drug Administration Audit and Inspection Center, Nanjing 210019, China; 4. Institute of Materia Medica Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100050, China; 5. School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210046, China)

Abstract: This study was focused on analyzing blood crystal products from six species of Chinese medicine deer blood crystals (sika deer, red deer) and commonly adulterated products (pig, cow, sheep, donkey). A method based on matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) combined with chemometric blood analysis was established to identify adulteration in deer blood crystals used in traditional Chinese medicine. In this study, the

bottom-up mass spectrometric proteomics approach was applied to acquire the peptide fingerprints of the highly abundant blood proteins, hemoglobin and albumin in samples. The blood crystal samples underwent pretreatments including reduction, alkylation, trypsinolysis, and desalting. Firstly, Skyline software was used to predict candidate peptides by identifying the theoretical characteristic peptides for each species, and the mass spectrometry data of the tryptic digests were collected using ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometer (UPLC-Q-TOF MS). Then, the mass spectrometry data were combined with UNIFI software and Uniprot database to accurately select a set of characteristic peptides that can reflect the differences between the target proteins, which was achieved by examining the presence of candidate characteristic peptides in the samples, as well as considering parameters such as the response, missed cut rate, and detection rate. Thereafter, a one-way controlled variable experiment was conducted to determine the optimal matrix for MALDI-TOF MS analysis. The laser energy was set to 90, and the spotting was performed using the mixing method. α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) was identified as the optimal matrix for the blood crystal samples. The optimized MALDI-TOF MS method was employed to obtain the characteristic peptide fingerprints of 10 batches of blood crystals for each of the six species. These fingerprints were then combined with principal component analysis (PCA) in order to achieve rapid and accurate differentiation of blood crystals from different sources. Verification of the method demonstrated that even low abundant adulteration ($\sim 10\%$) in authentic samples can be distinguished. The proposed method has the advantages of high specificity, rapidity, and convenience, which enables sensitive and specific detection of target characteristic peptides in complex matrix samples, and also can provide a highly accurate analytical approach for the identification of adulteration of deer blood crystals and blood crystal-based traditional Chinese medicine products.

Key words: matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS); deer blood crystals; peptide fingerprints; adulteration identification

鹿血晶为偶蹄目鹿科鹿属动物梅花鹿(*Cervus nippon*)、马鹿(*Cervus canadensis*)健康活体抽取的静脉鲜血的加工炮制品,最早见于《神农本草经》^[1]。现代药理学研究表明,鹿血晶可促进性器官发育^[2]、促进铁元素吸收和运输、激发骨髓造血功能^[3]、促进 T_4 细胞成熟、升高巨噬细胞吞噬百分率^[4]、改善卵巢癌小鼠的免疫抑制状态^[5],从而起到温肾补阳、补气益血、增强人体抗疲劳和免疫力等功效。受优质鹿血来源等多种因素的影响,鹿血晶及鹿血制品中存在较多掺伪现象,传统理化及显微鉴别技术难以准确区分鹿血与其他常见易得的动物血。因此,亟需建立专属性强、快速、灵敏的分析方法,实现鹿血晶和鹿血制品的质量评价及掺伪品来源的快速鉴别,保障其临床用药的安全性和有效性。

鹿血晶富含多种蛋白、氨基酸、脂类及微量元素^[6-7],成分复杂且药效物质和活性研究不

充分,同时还存在复杂的基质干扰,制约了其质量评价和真伪鉴别研究。目前,鹿血晶的真伪鉴别主要依赖于对其 DNA 和蛋白质进行检测。经典的 DNA 检测方式是聚合酶链式反应(PCR)^[8-10],其通过扩增物种特异性 DNA 序列,快速实现其他物种来源 DNA 组分的判别,但实验结果易受不同核酸样本或实验过程中试剂、器材携带的核酸污染的影响,从而导致鉴别的假阳性。用于蛋白特异性检测的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析技术^[11-12]和免疫沉淀技术^[13]分别利用凝胶的分子筛效应,根据亚基分子质量分离测定不同物种来源蛋白和抗原抗体特异性结合产生沉淀的方式,实现鹿血与其他动物血液的区分鉴定,但操作复杂、周期较长,且实验结果解读受人为因素的影响,同样具有假阳性和假阴性。近年来,质谱技术以高特异性、高灵敏

度,以及能够提供丰富的成分信息等优势成为分析小分子和生物大分子的有效手段。随着高分辨质谱技术和杂化质谱技术的迅猛发展,基于质谱的蛋白和多肽分析技术已成功应用于阿胶^[14-15]、鹿茸^[16]等珍贵药材的质量评价和关键属性探索。与其他类型质谱相比,基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)可在几分钟内完成大批量样品的检测,简化了检测流程、缩短了检测时间、降低了检测成本,且以特征肽段为靶标的MALDI-TOF MS技术已成功应用于肉类^[17]、奶类^[18]等食品的掺假行为检测与质量控制。

本工作将以梅花鹿、马鹿、猪、牛、羊、驴共6个物种的血晶制品为研究对象,基于自下而上的蛋白组学质谱技术,通过理论预测并结合高分辨质谱,筛选出1组具有物种差异的特征肽组合用于MALDI-TOF MS检测,并将肽指纹图谱与化学计量学结合,建立操作简便、专属性强、通量高的鹿血晶鉴别方法,旨在为鹿血晶及鹿血类中药制剂的鉴别提供方法参考。

1 实验部分

1.1 仪器与装置

ACQUITY UPLC I-Class 超高效液相色谱仪、Synapt XS QTOF 质谱仪:美国 Waters 公司产品;MALDI-TOF 8030 质谱仪:日本 Shimadzu 公司产品;DKS26 恒温水浴锅:上海森信实验仪器有限公司产品;Milli-Q[®] Academic 纯水仪:美国 Millipore 公司产品;Vortexgenie 2 涡旋混合仪:美国 Scientific Industries 公司产品。

1.2 材料与试剂

尿素、硫脲、二硫苏糖醇(DTT)、碘代乙酰胺(IAA):均为分析纯,美国 Sigma-Aldrich 公司产品;甲酸:分析纯,美国 Thermo Fisher 公司产品;甲醇、乙腈:均为色谱纯,德国 Merck 公司产品;胰蛋白酶:测序级,德国 ProGema 公司产品;芥子酸(SA)、2,5-二羟基苯乙酮(DHB)、 α -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA):纯度 98%,美国 Sigma-Aldrich 公司产品。

1.3 样品收集

梅花鹿、马鹿、猪、牛、羊、驴的血晶样品:由苏州红冠庄国药有限公司于现场屠宰或抽血

采集血液后,按照鹿血晶产品的生产工艺处理,确保各样品 100%真实性,每个物种各收集 10 份不同个体来源的重复样本。

7 批不同品牌、厂家、批号的鹿血晶样品:从网络上随机购买。

1.4 实验方法

1.4.1 裂解液制备 精确称取 4.80 g 尿素、1.52 g 硫脲、39.53 mg 碳酸氢铵于 10 mL 容量瓶中,加水溶解后定容。

1.4.2 样品制备 称取 200 mg 样品于 10 mL 纯化水中充分溶解作为工作液。取 50 μ L 工作液,加入 150 μ L 裂解液(8 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、50 mmol/L 碳酸氢铵)、80 μ L 0.5 mol/L DTT,于 37 $^{\circ}$ C 反应 2 h;加入 160 μ L 0.5 mol/L IAA,室温下避光反应 30 min 进行烷基化;加入 1.06 mL 50 mmol/L 碳酸氢铵稀释样品至尿素浓度为 0.8 mol/L;取 1 mL 稀释后的反应混合物,加入 30 μ L 200 mg/L 胰蛋白酶,于 37 $^{\circ}$ C 酶解反应 4 h;添加 40 μ L 甲酸终止酶解反应。为净化反应混合物,首先分别使用 2 mL 甲醇、2 mL 水依次活化、平衡 SPE 小柱,然后将反应混合物上样至 SPE 柱,使用 2% 甲醇水溶液冲洗以除去盐和其他杂质,最后使用 2 mL 甲醇洗脱并收集待测液。

超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(UPLC-QTOF MS)所测的样品经氮气吹干后用 2 mL 0.1% 甲酸水溶液复溶;MALDI-TOF MS 所测的样品需吸取 0.5 μ L 甲醇洗脱液滴于不锈钢靶板上,再滴加 0.5 μ L CHCA 基质覆盖在洗脱液上,室温晾干后用于后续分析。

1.5 实验条件

1.5.1 UPLC-QTOF MS 条件 色谱条件: ACQUITY PREMIER Peptide CSH C18 色谱柱(2.1 mm $\times$ 150 mm, 1.7 μ m);流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)和 0.1% 甲酸乙腈溶液(B);柱温 60 $^{\circ}$ C;流速 0.25 mL/min;进样量 10 μ L;梯度洗脱程序: 0~1 min(1%B), 1~65 min(1%~35%B), 65~65.1 min(35%~90%B), 65.1~68 min(90%B), 68~68.1 min(90%~1%B), 68.1~75 min(1%B)。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI)正离子模式,毛细管电压 3 kV,锥孔电压 30 V,离子源温度 120 $^{\circ}$ C,脱溶剂温度 450 $^{\circ}$ C,脱溶剂气流速 800 L/h,碰撞能量 20~50 V,参比化合物为亮氨酸-脑啡肽。

1.5.2 MALDI-TOF MS 质谱条件 线性模式; 质量扫描范围 m/z 500~3 000; 激光脉冲频率 50 Hz; 激光能量为 90; 1 个激光脉冲为 5 shots, 共需要激光脉冲 200 shots。

将质谱采集的原始数据使用仪器自带的 MALDI Solution Data Acquisition 软件进行基线校正和谱图平滑、对齐等处理。过滤器宽度减去基线设为 3, 采用 Gaussian 平滑方式, 平滑滤波器设为 3, 峰宽设为 1, 采用 Threshold Apex 峰分割法, 阈值偏移和响应设为 0.01 mV。

2 结果与讨论

2.1 特征肽段筛选

血液由血浆和血细胞组成, 血浆蛋白约占血浆干重的 7%, 其中 4% 为白蛋白; 而在血细胞中, 红细胞含量约占 45%, 主要由血红蛋白组成。因此, 以血液成分中丰度较高的血红蛋白和白蛋白为靶标, 使用 Skyline 软件 (<https://skyline.ms/project/home/software/Skyline/begin.view>), 以 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org>) 中各物种 FASTA 蛋白质数据库为背景数据库 (梅花鹿 123 条、马鹿

985 条、牛 345 428 条、羊 91 177 条、驴 35 032 条、猪 845 506 条), 并按照“物种”强制肽段的唯一性进行模拟酶切。经预测, 共筛选到各物种理论特征肽数量分别为梅花鹿 15 条、马鹿 15 条、猪 17 条、牛 15 条、羊 12 条、驴 5 条。

将 UPLC-QTOF MS 采集的样品数据导入 UNIFI 软件中。UNIFI 软件参数如下: 采用 Lock mass 对质谱提峰模块数据进行校正, 母离子偏差在 0.001% 以内, 子离子偏差在 0.002% 以内; 使用胰蛋白酶, 漏切位点为 1; 烷基化为固定修饰, 氧化为可变修饰; 采用亮氨酸脑啡肽 (LE) 校正液 (参考分子质量 556.277 1) 进行实时内标校正。在筛选出的理论特征肽中, 依次去除真实样品中未匹配到、二级碎片数量 < 10、漏切比例 > 1% 以及含甲硫氨酸的肽段, 最终筛选出各物种符合上述条件的肽段数量分别为梅花鹿 2 条、马鹿 2 条、猪 4 条、牛 3 条、羊 2 条、驴 2 条。最后, 结合 MALDI-TOF MS 出峰情况, 每个物种选择 1 条在指纹图谱中出峰好、响应高的特征肽段, 结果列于表 1, 其中 VNVDVVGAEALGR 为鹿血晶真品梅花鹿、马鹿共有特征肽。

表 1 各物种特征肽段信息

Table 1 Information of characteristic peptide for each species

物种 Species	肽段序列 Peptide sequence	Uniprot 序列号 Uniprot ID	理论分子质量 Theoretical molecular mass/u	实测分子质量 Measured molecular mass/u
梅花鹿/马鹿	VNVDVVGAEALGR	A0A220IG97	1298.7063	1298.4141
猪	VGGQAGAHGAEALER	P01965	1422.7084	1422.9746
牛	VGGHAAEYGAEALER	P01966	1529.7343	1529.3869
羊	DVFLGSFLYEYSR	P14639	1595.7740	1595.5938
驴	VGGNAGEFGAEALER	P01959	1476.7077	1476.3909

注: 理论分子质量为 Uniprot 中分子质量; 实测分子质量为 MALDI-TOF MS 检测的分子质量

2.2 MALDI-TOF MS 方法优化

2.2.1 基质种类优化 基质是 MALDI-TOF MS 分析中不可缺少的一部分, 其通过影响与样品的共结晶状态对待测物的谱图完整性和信号强度产生影响。本研究分别考察了 SA、DHB、CHCA 3 种常用于蛋白及多肽类样品的基质, 结果示于图 1。在其他条件相同的情况下, 以 CHCA 为基质时, m/z 500~3 000 内的样品谱图信号数量更多且强度更高, 因此选择 CHCA 作为基质进行后续实验。

2.2.2 仪器激光能量优化 仪器激光能量通过影响样品被激光碎裂的程度对数据采集结果产生影响。本研究考察了 6 个物种的目标肽段在激光能量分别为 70、80、90、100 情况下的响应, 示于图 2a。可见, 随着激光能量的增加, 肽段的响应均表现为先增大后降低或趋于平稳, 其中梅花鹿、猪、牛、羊、驴在激光能量为 90 时出现最大值, 马鹿在激光能量为 80 时出现最大值, 且 4 个激光能量下的响应相差较小。综合考虑, 选择激光能量 90 用于后续实验。

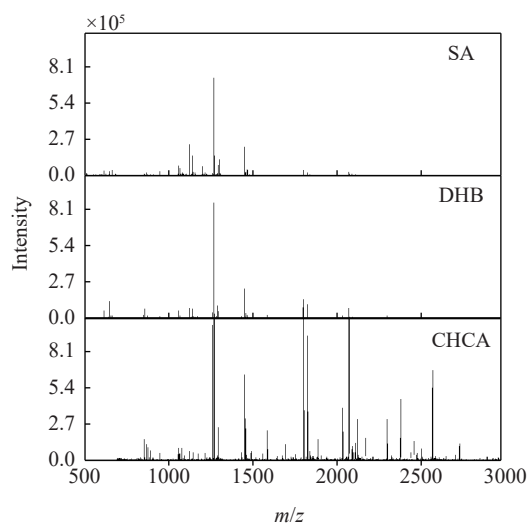


图1 基质种类优化图

Fig. 1 Optimization diagrams of matrix species

2.2.3 点样方式优化 点样方式通过影响样品与基质的混合程度进一步影响两者的共结晶状态。本研究分别考察了三明治法(先在靶板上滴加基质溶液, 5~10 s后吸走, 然后滴加样品溶液, 晾干后将等体积的基质溶液覆盖在样品上)、混匀法(样品溶液与基质溶液等体积混合后点样)、覆盖法(先在靶板上滴加基质溶液, 然后将等体积的样品溶液覆盖在基质上)3种常用的点样方式, 结果示于图2b。可见, 使用混匀法时, 所有样品对应肽段的响应强度均最高, 因此选择该方法用于后续实验。

2.3 肽指纹图谱建立

采用1.4节方法对梅花鹿、马鹿、猪、牛、羊、驴等6个物种各10批次样品进行制备, 采

用1.5.2节条件采集数据, 建立各物种的MALDI-TOF MS肽指纹图谱, 示于图3。

2.4 掺假鉴别模型的构建

2.4.1 PCA与HCA分析 以6条特征肽段为变量, 利用梅花鹿、马鹿、猪、牛、羊、驴等6个物种各10批次的样品MALDI-TOF MS指纹图谱数据进行主成分分析(PCA), 结果示于图4a。鹿血晶的真品梅花鹿和马鹿与掺伪样品猪、牛、羊、驴之间有明显的聚类趋势, 可在2个主成分下得到有效区分。

进一步对数据进行层次聚类分析(HCA), 结果示于图4b。可见, 不同物种的血晶样本被成功分为5类, 进一步验证了PCA结果的可靠性。

2.4.2 不同掺假比例混伪品PCA分析 将猪、牛、羊、驴样品以1:1:1:1(m/m)比例混合后作为伪品, 按照伪品含量0%、10%、30%、50%、70%比例与鹿血晶真品(梅花鹿或马鹿)进行互掺($n=3$), 根据1.4节方法制备样品, 1.5.2节条件采集数据, 对含有不同比例的伪品样品数据进行PCA分析, 结果示于图5。可以看出, 不同掺假比例的样品均可与真品有效区分, 且随着掺假比例增高, 掺假样品逐渐远离真品, 表明该模型可以较好地完成鹿血晶真伪品的定性鉴别。

2.5 样品检测

本实验将从网络上随机购买的7份不同品牌、不同厂家的市售鹿血晶产品进行前处理和质谱数据采集, 使用7批市售样品($n=3$)与2.3节中的6个标准物种($n=10$)共计81个数据点进行

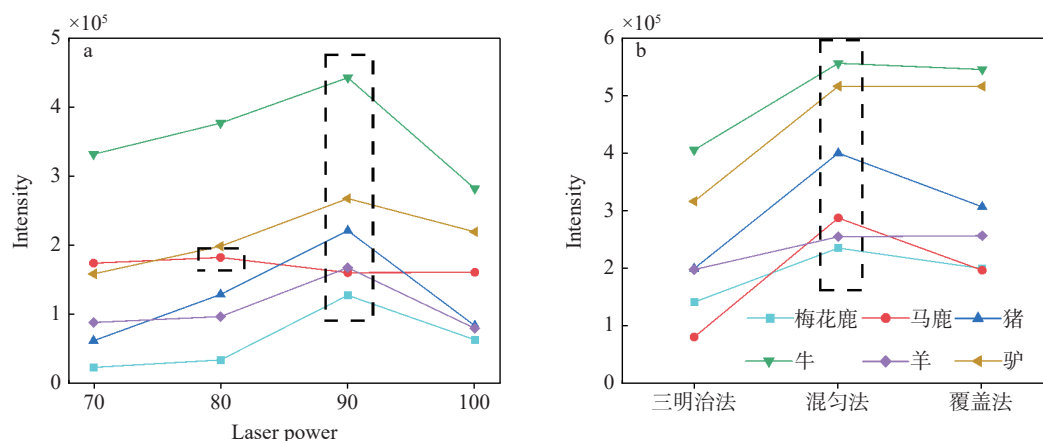
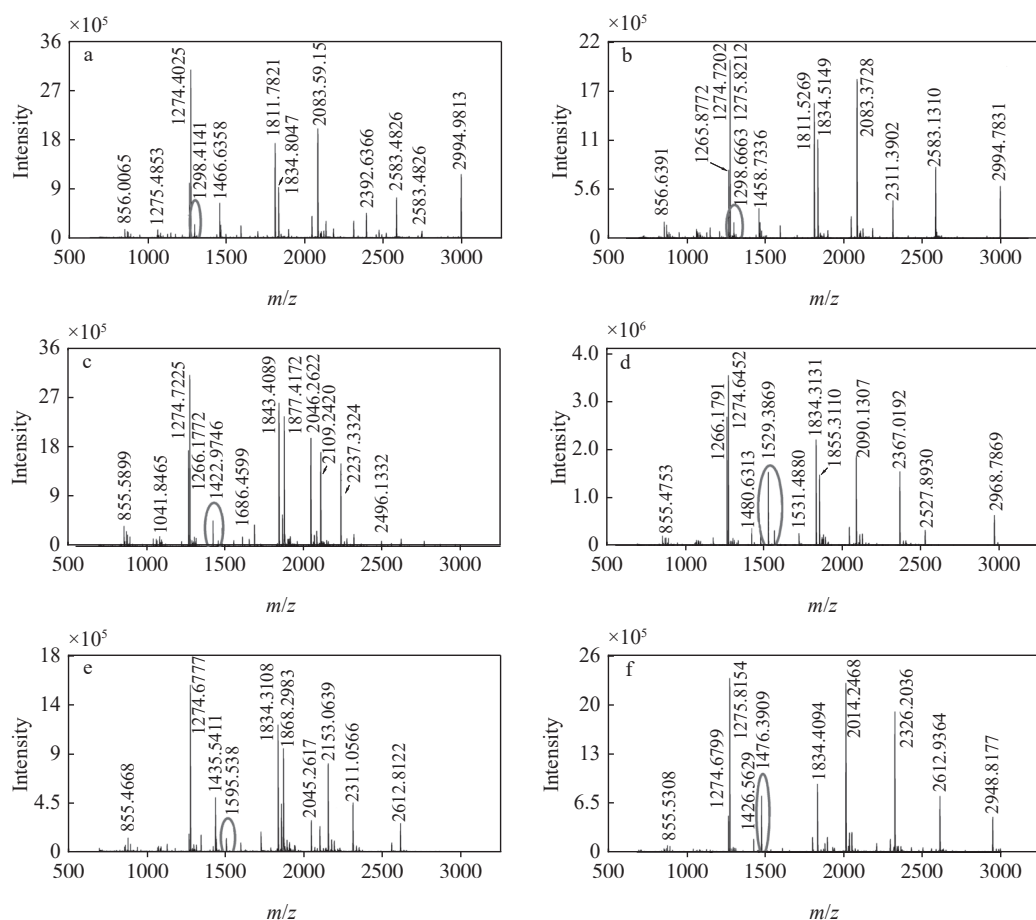


图2 激光能量(a)和点样方式(b)优化图

Fig. 2 Optimization diagrams of laser power (a) and sample loading method (b)



注: a. 梅花鹿; b. 马鹿; c. 猪; d. 牛; e. 羊; f. 驴

图3 6个物种的MALDI-TOF MS肽指纹图谱

Fig. 3 MALDI-TOF MS peptide fingerprints of 6 species

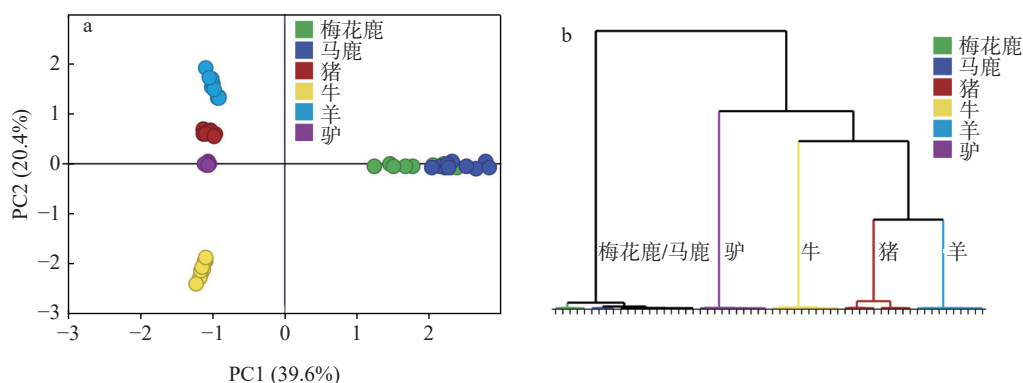


图4 6个物种的PCA(a)及HCA(b)得分图

Fig. 4 PCA (a) and HCA (b) scoring plots of 6 species

PCA 分析, 结果示于图6。可以看出, 在7批市售样品中, 样品1、2、3、4、7与鹿血晶真品呈显著聚类趋势, 样品5、6与鹿血晶真品被显著区分, 且样品5、6分别与猪、牛标准品有一定的聚

类趋势。因此, 推测样品5、6为伪品, 可能分别掺入了猪血和牛血, 其余5批样品为真品。经高分辨质谱对市售样品采集分析后, 与本方法结果一致, 符合预期。

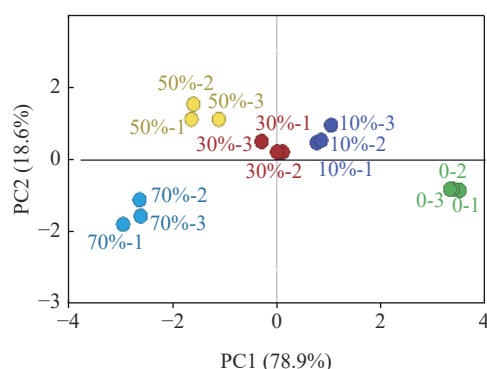


图5 不同比例掺伪品的PCA得分图

Fig. 5 PCA scoring plot of adulterated products with different proportions

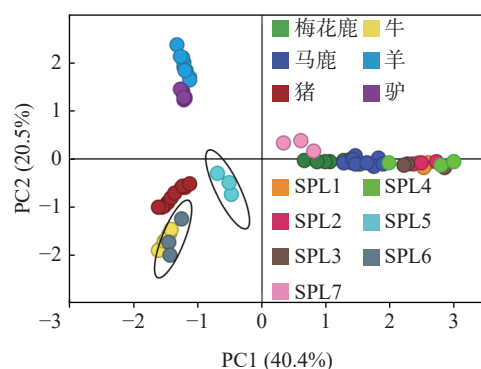


图6 市售样品检测PCA得分图

Fig. 6 PCA scoring plot of commercially available samples

3 结论

本研究采用自下而上的蛋白质组学技术结合高分辨质谱,筛选出适合MALDI-TOF MS检测的1组特征肽组合,通过将MALDI-TOF MS肽指纹图谱与主成分分析相结合,对鹿血晶真品(梅花鹿、马鹿)与常见混伪品(猪、牛、羊、驴)进行分析。结果表明,鹿血晶真品与混伪品在聚类上呈显著差异,即使是含有低至10%混伪品的样本也能够被有效区分,该方法可以有效鉴别市场上常见的鹿血晶及鹿血制品的真伪。与传统的液相色谱-质谱联用技术相比,该方法操作简便、检测速度快,且具有较高的通量,可以为鹿血晶及鹿血类中药制剂的发展提供有力的技术支持。

参考文献:

[1] 袁相恋, 薄士儒, 李庆杰, 王全凯. 鹿血化学成分和药理作用及其应用研究进展[J]. 经济动物学报, 2011, 15(4):

207-211.

YUAN Xianglian, BO Shiru, LI Qingjie, WANG Quankai. Research progress on chemical compositions, pharmacological effects and applications of Deer blood[J]. Journal of Economic Animal, 2011, 15(4): 207-211(in Chinese).

[2] 邓万娟, 梁潇, 刘娇, 胡涛, 蔡敏芳, 罗萍, 钱海兵. 鹿血晶对肾虚小鼠性激素水平的影响[J]. 贵州中医药大学学报, 2023, 45(5): 46-50.

DENG Wanjuan, LIANG Xiao, LIU Jiao, HU Tao, CAI Minfang, LUO Ping, QIAN Haibing. Effect of Deer blood crystal on sex hormone level in mice with kidney-Yang deficiency[J]. Journal of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, 2023, 45(5): 46-50(in Chinese).

[3] 王春霞, 管春姮, 高鹏, 于晓蕾, 杨彧韬. 梅花鹿血粉对大鼠营养性贫血改善作用的研究[J]. 经济动物学报, 2022, 26(2): 116-120.

WANG Chunxia, GUAN Chunheng, GAO Peng, YU Xiaolei, YANG Yutao. Improving effect of Sika Deer blood powder on nutritional anemia of rats[J]. Journal of Economic Animal, 2022, 26(2): 116-120(in Chinese).

[4] 李京蔓, 潘宇晨, 夏晓雨, 李丹, 窦环, 侯亚义. 中药饮片鹿血晶对巨噬细胞的免疫调节作用研究[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(7): 810-814.

LI Jingman, PAN Yuchen, XIA Xiaoyu, LI Dan, DOU Huan, HOU Yayi. Immunoregulating effects of Deer blood crystal on macrophages[J]. Chinese Journal of Immunology, 2020, 36(7): 810-814(in Chinese).

[5] 夏永严. 为进行化疗后出现血小板减少症的晚期恶性肿瘤患者加用鹿血晶进行治疗的效果研究[J]. 当代医药论丛, 2018, 16(22): 181-182.

XIA Yongyan. Study on the effect of Deer blood crystal in the treatment of advanced malignant tumor patients with thrombocytopenia after chemotherapy[J]. Contemporary Medical Symposium, 2018, 16(22): 181-182(in Chinese).

[6] 韩欢胜, 郭喜明, 徐馨, 柴孟龙. 梅花鹿鹿血中氨基酸种类组成及含量测定[J]. 特种经济动植物, 2021, 24(7): 3-5.

HAN Huansheng, GUO Ximing, XU Xin, CHAI Menglong. Composition and content determination of amino acids in Sika Deer blood[J]. Special Economic Animals and Plants, 2021, 24(7): 3-5(in Chinese).

[7] 赵卉, 刘继永, 王峰, 肖家美, 张秀莲, 李光玉. 鹿茸等五种鹿产品中氨基酸含量及组成对比分析[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(5): 1 056-1 058.

- ZHAO Hui, LIU Jiyong, WANG Feng, XIAO Jiamei, ZHANG Xiulian, LI Guanyu. Comparative analysis of amino acid composition in the velvet antler, Deer blood and other three kinds of Deer products[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2015, 26(5): 1 056-1 058(in Chinese).
- [8] 党平, 杜雨威, 关艳艳. 鹿及其它常见家畜家禽血液的聚合酶链式反应检测[C]// 第十九届全国药史本草学术研讨会暨 2017 年江苏省药学会药学史专业委员会年会论文集. 苏州, 2017: 311-316.
- [9] 周辰杰, 党平, 周翠霞, 张晓晨. 鹿科不同物种血液的分子鉴定[J]. 中成药, 2019, 41(10): 2 530-2 535.
- ZHOU Chenjie, DANG Ping, ZHOU Cuixia, ZHANG Xiaochen. Molecular identification of blood from different species of Cervidae[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2019, 41(10): 2 530-2 535(in Chinese).
- [10] 沈海英, 鲍方名, 顾珉, 张国林, 黄依雯, 李倩. 中药饮片鹿血晶 PCR 检测方法的建立[J]. 江西中医药, 2015, 46(10): 67-68, 76.
- SHEN Haiying, BAO Fangming, GU Min, ZHANG Guolin, HUANG Yiwen, LI Qian. Establishment of PCR detection method for Deer blood crystal in traditional Chinese medicine decoction pieces[J]. Jiangxi Journal of Traditional Chinese Medicine, 2015, 46(10): 67-68, 76(in Chinese).
- [11] 郭月秋, 陈代贤, 刘辉, 王萍萍. 聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴别鹿血与其它动物血[J]. 时珍国医国药, 2000, 11(3): 232.
- GUO Yueqiu, CHEN Daixian, LIU Hui, WANG Pingping. Differential diagnosis of Deer blood from other animal blood by polyacrylamide gel electrophoresis[J]. LiShiZhen Medicine and Materia Medica Research, 2000, 11(3): 232(in Chinese).
- [12] 范青, 刘辉, 王萍萍, 郭月秋, 陈代贤. 聚丙烯酰胺凝胶电泳在鹿血与其他动物血鉴别中的应用[J]. 中医兽医学报, 2000, 28(5): 39-40.
- FAN Qing, LIU Hui, WANG Pingping, GUO Yueqiu, CHEN Daixian. Application of polyacrylamide gel electrophoresis in differentiating Deer blood from other animal blood[J]. Acta Chinese Medicine and Pharmacology, 2000, 28(5): 39-40(in Chinese).
- [13] 张振学, 穆培, 刘珂, 张纯录, 王丽茹. 鹿血鉴别新方法[J]. 中药材, 1996, 19(2): 96-97.
- ZHANG Zhenxue, MU Pei, LIU Ke, ZHANG Chunlu, WANG Liru. A new method for identification of Deer blood[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 1996, 19(2): 96-97(in Chinese).
- [14] LIU R, HUANG Y, XU H, ZHENG Y, LIU Y, HAN S, YANG M, XIE Y, WANG K, DUAN J A, LI L. A strategy for identifying species-specific peptide biomarkers in deer-hide gelatin using untargeted and targeted mass spectrometry approaches[J]. Analytica Chimica Acta, 2019, 1 092: 32-41.
- [15] 房芳, 张九凯, 马雪婷, 苏敏, 陈颖. 基于特征肽段的阿胶中异源性物种鉴别[J]. 食品科学, 2019, 40(16): 267-273.
- FANG Fang, ZHANG Jiukai, MA Xueting, SU Min, CHEN Ying. Identification of heterologous species in donkey-hide gelatin based on specific peptides[J]. Food Science, 2019, 40(16): 267-273(in Chinese).
- [16] 周倩倩, 薛菲, 周广涛, 解盈盈, 梅桂雪, 林永强, 汪冰. 基于 UPLC-MS/MS 法的定坤丹中鹿茸的专属性鉴别及驯鹿茸筛查[J]. 质谱学报, 2023, 44(5): 624-634.
- ZHOU Qianqian, XUE Fei, ZHOU Guangtao, XIE Yingying, MEI Guixue, LIN Yongqiang, WANG Bing. Specificity identification of *Cervi Cornu Pantotrichum* and screening of rangifer tarandus Linnaeus in Dingkundan by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2023, 44(5): 624-634(in Chinese).
- [17] PU K, QIU J, TONG Y, LIU B, CHENG Z, CHEN S, NI W X, LIN Y, NG K M. Integration of non-targeted proteomics mass spectrometry with machine learning for screening cooked beef adulterated samples[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(4): 2 173-2 182.
- [18] KRITIKOU A S, AALIZADEH R, DAMALAS D E, BARLA I V, BAESSMANN C, THOMAIDIS N S. MALDI-TOF-MS integrated workflow for food authenticity investigations: an untargeted protein-based approach for rapid detection of PDO feta cheese adulteration[J]. Food Chemistry, 2022, 370: 131 057.

(收稿日期: 2024-04-12; 修回日期: 2024-05-11)