

## 食品中雞蛋卵白蛋白之質譜檢驗方法

翁詠翔 王晨竹 吳幸芷 崔秀煒 林澤揚  
高雅敏 曾素香 王德原

食品藥物管理署研究檢驗組

### 摘 要

食品安全一直以來為我國持續注意的課題，為加強食品過敏原的標示資訊，我國參考國際規範及國人發生食品過敏之臨床調查資料，規定11大項食品過敏原須強制標示，其中雞蛋食品為食品過敏原大宗。利用質譜技術檢測食品過敏原為國際檢驗趨勢，本署亦積極研發蛋白質質譜檢測方法。在液相層析四極桿時間飛行式質譜儀(Liquid chromatograph-quadrupole time-of-flight mass spectrometer, LC/Q-TOF MS)分析中，已確認雞蛋過敏原蛋白(雞蛋卵白蛋白：Ovalbumin)可做為定性方法之依據，因此接續以液相層析串聯三段式四極桿質譜儀(Liquid chromatograph-triple quadrupole mass spectrometer, LC/QqQ MS)進行食品中之確效試驗。本研究價購市面上常見之雞蛋產品基質(餅乾與黃豆)的加工食品為研究對象，測試此方法於不同加工產品中可否偵測到標的胜肽，結果顯示選定專一胜肽其離子對之滯留時間(Retention time)、離子對訊雜比(Signal/noise ratio)、離子比率(Ion ratio)皆符合確效規範，偵測極限為2 ppm。本研究建立之方法可於雞蛋之食品中偵測到雞蛋卵白蛋白，檢測17件市售產品皆符合成分標示，因此利用三段式四極桿質譜儀檢測食品中雞蛋過敏原具有高準確、高靈敏且高穩定性優點，更進一步強化此方法研究之完備性。

**關鍵詞：**過敏原、卵白蛋白、液相層析串聯質譜儀、蛋白質確效分析

### 前 言

過敏原是指能引起過敏的物質。食入性過敏原會隨著食物經由消化道進入體內，產生皮膚或腸胃道症狀或全身性過敏反應，更甚者則可能導致死亡。近年來，食品過敏原的風險日益提高，各國對於食品過敏原之控管日益重視。全世界8%幼童和2%成人對食物過敏且呈現上升趨勢，而蛋類為幼童引起過敏反應的主要原因之一。各國針對蛋類的過敏原皆有相關規定，顯示其為高度重要性的過敏原<sup>(1,2)</sup>。有

鑑於此，開發靈敏且準確之雞蛋過敏原檢驗方法，用於確認過敏原標示是否正確是極重要的。

由於市售食品五花八門，可能經過高度加工過程或是含各種的添加物，因此核酸的檢測方法可能產生偽陰性結果的疑慮<sup>(3,4)</sup>。酵素連結免疫吸附法(Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA)利用抗體檢測蛋白質，在複雜的加工產品與基質中亦可能導致偽陰偽陽性的結果。而使用LC-MS/MS法檢測過敏原具有靈敏度高，專一性佳，結果準確等諸多優點<sup>(5)</sup>。

目前世界各國公告的方法中，並沒有以質

譜技術檢驗過敏原的方法，大多的過敏原檢測方法停留於學術研究的階段。主要原因是質譜檢測大分子蛋白質為近年新興的技術，生物資訊的發展造就數據資料庫的日趨成熟，因此逐漸認為質譜技術將是檢測過敏原的新利器<sup>(6,7)</sup>。在素食產品標示規定中，規定包裝食品宣稱為素食者，應於包裝上顯著標示「全素或純素」、「蛋素」、「奶素」、「奶蛋素」、「植物五辛素」等字樣<sup>(8)</sup>，因此開發雞蛋過敏原質譜定性方法，可明確鑑定出動物性成分中雞蛋之過敏原蛋白，並且可以應用於檢測素食產品的雞蛋成分。

本研究使用丙酮溶液直接將雞蛋蛋白中過敏原蛋白質萃取出來，隨後利用高解析質譜儀分析檢體內含物之質荷比，並利用蛋白資料庫比對將所含之胜肽序列，再藉由分析軟體將胜肽片段組合。由於目前歐盟規範判斷檢體含標的蛋白至少須探測出2條專一性胜肽片段<sup>(9,10)</sup>，本研究藉由與美國國家生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)資料庫比對獲得專一性胜肽片段資訊後，即可利用專一性胜肽片段完成蛋白身分鑑定，定性分析雞蛋的卵白蛋白(Ovalbumin)<sup>(11-13)</sup>。續以小麥類(全素餅乾)與黃豆類(全素豆干)作為基質，模擬食品中雞蛋添加的情形並進一步進行定性確效試驗，以液相層析串聯質譜儀檢測，建立雞蛋過敏原檢驗方法，參考歐盟與衛生福利部食品藥物管理署(以下簡稱食藥署)食品化學檢驗方法之確效規範，完備方法開發流程<sup>(14-17)</sup>，進而為國人食用安全及健康把關。

## 材料與方法

### 一、檢體來源

本實驗價購市售10件餅乾類與7件豆干類素食產品作為定性確效分析用途。

### 二、試藥、標準品

甲酸(Formic acid)與乙腈(Acetonitrile)採液相層析級；丙酮(Acetone)、尿素(Urea)及碳酸氫銨(Ammonium bicarbonate)採試藥特級；去離子水(比電阻於25℃可達18 MΩ·cm以上)。Bradford Reagent蛋白質定量套組、二硫蘇糖醇(Dithiothreitol, DTT)、碘乙胺(Iodoacetamide, IAA)、三氟乙酸(Trifluoroacetic acid, TFA)、氫氧化鈉(Sodium hydroxide, NaOH)、胰蛋白酶(Trypsin, 13000-20000 BAEE units/mg)購自Sigma-Aldrich Co. (Missouri, USA)。對照用標準品卵白蛋白(Ovalbumin)(> 98.0%) 購自Sigma-Aldrich Co. (Missouri, USA)。

### 三、裝置及儀器設備

- (一)離心機(Allegra 25R centrifuge, Beckman Coulter Inc., California, USA)。
- (二)旋渦混合器(Vortex-Genie 2 mixer, Scientific Industries, Inc., New York, USA)。
- (三)水平式振盪恆溫水浴槽(Horizontal shaking bath, Firstek Co., Ltd, USA)。
- (四)超音波洗淨機(Branson 5510, Branson Ultrasonic Co., USA)。
- (五)均質機(Mini-Prep Processor, DLC-1-BCH (Cuisinart, New Jersey, USA)。
- (六)高速振盪器(Recipro Shaker, SR-2S (Taitec Co. Ltd., Japan)。
- (七)離心濃縮裝置(CentriVap Aqueous System (Labconco Corp., USA)。
- (八)固相萃取匣(Oasis HLB cartridge, 6 mL, 500 mg, Waters Co., Massachusetts, USA)。
- (九)層析管柱(BioSuite™ C18 PA-A, 3 μm, 2.0 × 150 mm, ACQUITY UPLC CSH130 C18 1.7 μm, 2.1 × 150 mm, Waters Co., Massachusetts, USA)。
- (十)液相層析串聯四極桿飛行時間式質譜儀

(Agilent, Waldbronn, Germany)產品，包含 Agilent 1260液相層析儀(high performance liquid chromatograph, HPLC)系統及四極桿飛行時間式質譜儀Q-TOF 6530，離子源採電灑游離法(Electron spray ionization, ESI)，同時搭配控制軟體Masshunter之電腦系統。

(二)液相層析串聯三段式四極桿質譜儀 (Agilent, Waldbronn, Germany)產品，包含 Agilent 1290 液相層析儀(Ultra performance liquid chromatograph, UPLC)系統及三段式四極桿質譜儀 QqQ 6490，離子源採電灑游離法(Electron spray ionization, ESI)，同時搭配控制軟體Masshunter之電腦系統。

#### 四、檢液之調製

- (一)1 M氫氧化鈉溶液：稱取氫氧化鈉2 g，以去離子水溶解使成50 mL。
- (二)50 mM 碳酸氫銨溶液(pH 8.0)：稱取碳酸氫銨3.95 g，以去離子水使成1000 mL，以1 M氫氧化鈉溶液調整pH值至8.0。
- (三)含8 M尿素之50 mM碳酸氫銨溶液：稱取尿素240.24 g，以50 mM碳酸氫銨溶液(pH 8.0)溶解使成500 mL。
- (四)1 M二硫蘇糖醇溶液：稱取二硫蘇糖醇154.3 mg，以去離子水溶解使成1 mL。
- (五)500 mM碘乙醯胺溶液：稱取碘乙醯胺92.5 mg，以去離子水溶解使成1 mL。
- (六)1 mg/mL胰蛋白酶溶液：稱取胰蛋白酶10 mg，加去離子水溶解使成10 mL。
- (七)含0.5%三氟乙酸溶液：取三氟乙酸5 mL，加去離子水使成1000 mL。
- (八)含0.1%甲酸之乙腈溶液：取甲酸1 mL，加乙腈使成1000 mL。
- (九)75%乙腈溶液：取乙腈750 mL，加去離子水使成1000 mL。
- (十)含0.1%甲酸之5%乙腈溶液：取甲酸0.1 mL及乙腈5 mL，加去離子水使成100

mL。

#### 五、移動相溶液之調製

- (一)移動相溶液A：取甲酸1 mL，加去離子水使成1000 mL，供作移動相溶液A。
- (二)移動相溶液B：取甲酸1 mL，加乙腈使成1000 mL，供作移動相溶液B。

#### 六、標準溶液之配製

稱取卵白蛋白對照用標準品約5 mg，精確稱定，以50 mM碳酸氫銨溶液(pH 8.0)溶解並定容至5 mL，供作標準溶液，冷凍貯存備用。

#### 七、定性確效分析檢液製備

- (一)蛋白質沉澱：將檢體磨碎均質，取約0.5 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，加入50 mM碳酸氫銨溶液(pH 8.0) 3 mL，旋渦混合，置於水平式振盪恆溫水浴槽37℃水浴中以100 rpm水平振盪30分鐘，再以高速振盪器振盪30分鐘，以5500 × g離心10分鐘，取上清液。加入4倍體積預冷之丙酮，於4℃作用3小時，再於4℃，以5500 × g離心10分鐘，棄上清液。以丙酮1 mL清洗離心管壁，再於4℃，以5500 × g離心10分鐘，棄上清液，沉澱物置於抽風櫃中風乾15分鐘。
- (二)蛋白質定量：取七、(一)節風乾之沉澱物，加入含8 M尿素之50 mM碳酸氫銨溶液1 mL，旋渦混合，以超音波振盪至完全溶解，作為檢液原液。取檢液原液10 μL，經50 mM碳酸氫銨溶液(pH 8.0)稀釋10倍後，以Bradford Reagent蛋白質定量套組進行蛋白質定量。
- (三)酵素水解：取七、(二)節剩餘之檢液原液，加入1 M二硫蘇糖醇溶液10 μL，旋渦混合，於水平式振盪恆溫水浴槽60℃水浴中以100 rpm水平振盪60分鐘，加入500 mM碘乙醯胺溶液60 μL，旋渦混合，置於暗

處反應30分鐘。加入50 mM碳酸氫銨溶液(pH 8.0) 9 mL，再加入適量之1 mg/mL胰蛋白酶(註)，旋渦混合，於37°C水浴以100 rpm水平振盪反應16 - 18小時。加入甲酸50  $\mu$ L，旋渦混合，於37°C水浴反應30分鐘，以5500  $\times$ g離心10分鐘，取上清液，供淨化用。

註：胰蛋白酶添加量與檢液原液蛋白質含量之比例為1 : 50 (w/w)。

(四)淨化：取七、(三)節供淨化用之溶液，注入預先以含0.1%甲酸之乙腈溶液5 mL及0.5%三氟乙酸溶液5 mL潤洗之固相萃取匣，棄流出液。依序以0.5%三氟乙酸溶液5 mL及去離子水5 mL清洗，棄流出液。再以75%乙腈溶液5 mL沖提，收集沖提液於15 mL離心管中，真空離心濃縮至乾，殘留物以含0.1%甲酸之5%乙腈溶液500  $\mu$ L溶解，經12000  $\times$ g離心10分鐘，取上清液，以濾膜過濾，供作檢液。

## 八、定性分析

### (一)胜肽序列鑑定

雞蛋蛋白質經胰蛋白酶作用後會產生多段胜肽，經碰撞誘導解離(Collision-induced dissociation, CID)作用後提取碎片離子的離子層析圖譜。藉由Agilent's Spectrum Mill生物資訊分析工作平台，將得到的MS/MS圖譜與資料庫做比對，進一步決定胜肽的胺基酸序列並確認蛋白質的種類及物種。

### (二)專一性胜肽之選定

在眾多的胜肽中，藉由與NCBI資料庫做比對出專一性胜肽，選取最強子離子作為定量離子，並且選次強離子為定性離子。此外，根據歐盟的歐洲總體官方藥品管制實驗室網絡(GEON)規定對於一個蛋白質的精確鑑定必須要有兩條以上的專一性胜肽<sup>(16)</sup>，為增加專一性再選取另一至兩條訊

號較強的專一性胜肽做為輔助，進一步確認所偵測為目標蛋白質。

## 九、質譜儀相關參數條件

液相層析飛行式質譜儀使用BioSuite™ C18 PA-A, 3  $\mu$ m, 2.0  $\times$  150 mm (Waters Co., USA)管柱，液相層析四極桿質譜儀使用ACQUITY UPLC CSH130 C18 1.7  $\mu$ m, 2.1  $\times$  150 mm (Waters Co., USA)管柱，相關層析條件與質譜儀參數如表所示(表一、二)。

## 十、偵測極限評估

取空白檢體加入標準蛋白質(卵白蛋白)，

表一、液相層析質譜儀之液相層析梯度分析條件

質譜儀類型	時間(min)	A (%)	B (%)
四極桿飛行時間式	0.0 $\rightarrow$ 5.0	95 $\rightarrow$ 95	5 $\rightarrow$ 5
	5.0 $\rightarrow$ 60.0	95 $\rightarrow$ 45	5 $\rightarrow$ 55
	60.0 $\rightarrow$ 61.0	45 $\rightarrow$ 5	55 $\rightarrow$ 95
	61.0 $\rightarrow$ 63.0	5 $\rightarrow$ 5	95 $\rightarrow$ 95
三段式四極桿式	0.0 $\rightarrow$ 0.5	95 $\rightarrow$ 90	5 $\rightarrow$ 10
	0.5 $\rightarrow$ 10.0	90 $\rightarrow$ 70	10 $\rightarrow$ 30
	10.0 $\rightarrow$ 10.5	70 $\rightarrow$ 0	30 $\rightarrow$ 100
	10.5 $\rightarrow$ 14.0	0 $\rightarrow$ 0	100 $\rightarrow$ 100

表二、四極桿飛行時間式質譜儀之質譜分析參數

Q-TOF	Parameter	Value
Ion Source AJS ESI	Gas Temp	300 °C
	Sheath Gas Temp	350 °C
-	Vcap	4000 V
MS	Range	285-1700 m/z
	Acquisition rate	3 spectra/s
MS/MS	Range	100-1700 m/z
	Acquisition rate	2 spectra/s
Ramped Collision Energy	Charge State	slope
	2	3.1
	3	3.6
	>3	3.6

添加濃度由50 ppm開始往下做序列稀釋，依所建立之方法製備檢液並以液相層析串聯三段式四極桿質譜儀分析。以每條胜肽的定量離子訊號與雜訊之比值 (Signal/noise ratio, S/N ratio) 大於10作為偵測極限(Limit of detection, LOD)。

## 十一、市售產品之定性確效分析

取檢體進行檢液製備，並以液相層析串聯三段式四極桿質譜儀分析。參考歐盟與食藥署食品化學檢驗方法之確效規範<sup>(17)</sup>，將參數分為以下數個項目進行定性確效分析：

- (一)前驅離子(Precursor Ion)產生之二對產物離子(Product Ion)皆可檢測。
- (二)離子對滯留時間(Retention time, RT)其誤差必須小於1分鐘。
- (三)離子對之訊雜比(Signal/noise ratio, SN ratio)定量離子必須大於10；定性離子必須大於3。
- (四)離子比率(Ion Ratio)在同一序列標準品的平均離子比率 $\pm 30\%$ 以內。
- (五)各濃度同日(Intra-day)重複性(Repeatability)評估變異係數(Coefficient of Variation, CV)必須小於20%。
- (六)各濃度異日(Inter-day)中間精密度

(Intermediate precision)評估變異係數(Coefficient of Variation, CV)必須小於20%。每樣市售產品的數據皆必須確認以上所有參數，判斷是否符合規範，完成確效分析。

## 結果與討論

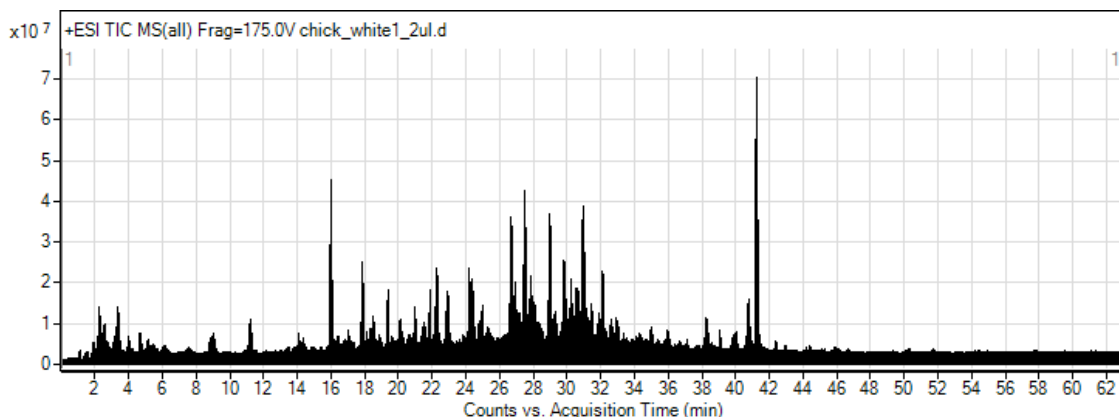
### 一、定性分析結果

#### (一)胜肽序列鑑定結果

將雞蛋蛋白依所建立的方法進行試驗，以四極桿飛行時間式質譜儀(Q-TOF)分析並獲得其總離子圖(圖一)。藉由Agilent's Spectrum Mill 生物資訊分析工作平台，將得到的MS/MS圖譜與資料庫做比對。實驗結果顯示檢測到多種雞蛋蛋白過敏原(表三)。

#### (二)專一性胜肽選定之確認及優化

選擇之雞蛋卵白蛋白胜肽進行MS/MS分析後，將每條專一性胜肽撞碎後，選擇訊號最強產物離子(Product Ion)為定量離子，訊號次強產物離子為定性離子。結果顯示卵白蛋白中三條專一性胜肽分別為GGLEPINFQTAADQAR，其前驅離子(Precursor Ion)質荷比為844.4 (二



圖一、雞蛋蛋白利用胰蛋白酶水解後以液相層析串聯四極桿飛行時間式質譜儀分析之總離子圖



價離子)，其優化後選定之產物離子質荷比分別為1331.7與1121.5，最佳碰撞能量皆為31 eV，層析沖提時間為6.24分鐘；ELINSWVESQTNGIIR，其前驅離子質荷比為930.0 (二價離子)，其優化後選定之產物離子質荷比分別為1116.6與1017.5，最佳碰撞能量分別為29與37 eV，層析沖提時間為8.43分鐘；LTEWTSSNVMEER，其前驅離子質荷比為791.4 (二價離子)，其優化後選定之產物離子質荷比分別為1052.5與951.4，最佳碰撞能量皆為25 eV，層析沖提時間為5.04分鐘(表四)。

(三)空白基質(全素餅乾與全素豆干)中專一性胜肽之優化取空白檢體依所建立方法進行試驗，以外添加方式加入適當標準蛋白質溶液，得到空白基質之外添加檢液，並以液相層析串聯三段式四極桿質譜儀(LC-QqQ)分析。結果可以發現所設定的沖提時間與此沖提時間所偵測的質荷比皆

可檢測到專一性胜肽(圖二)。

二、偵測極限測試結果

空白檢體添加標準蛋白質，添加濃度由50 ppm開始往下做序列稀釋，依所建立之方法製備檢液並以LC-QqQ分析。以每條胜肽的定量離子訊號與雜訊之比值(Signal/noise ratio, S/N ratio)大於10作為偵測極限(Limit of detection, LOD)，且定性離子對之訊號雜訊比大於3之濃度則定義為檢測極限。卵白蛋白之專一性胜肽(GGLEPINFQTAADQAR)偵測極限為2 µg/g (ppm)。其中，每個檢體於同一個分析日期進行3重複以上的試驗，並且進行3個分析日期，確認偵測極限實驗之重複性與精準度。

三、確效分析結果

確效分析項目如材料與方法十一所述，實驗結果需每一個數據符合以上所有參數之規範，最後完成定性確效分析。而表五根據不同添加濃度及不同的規範參數所列出的統計表

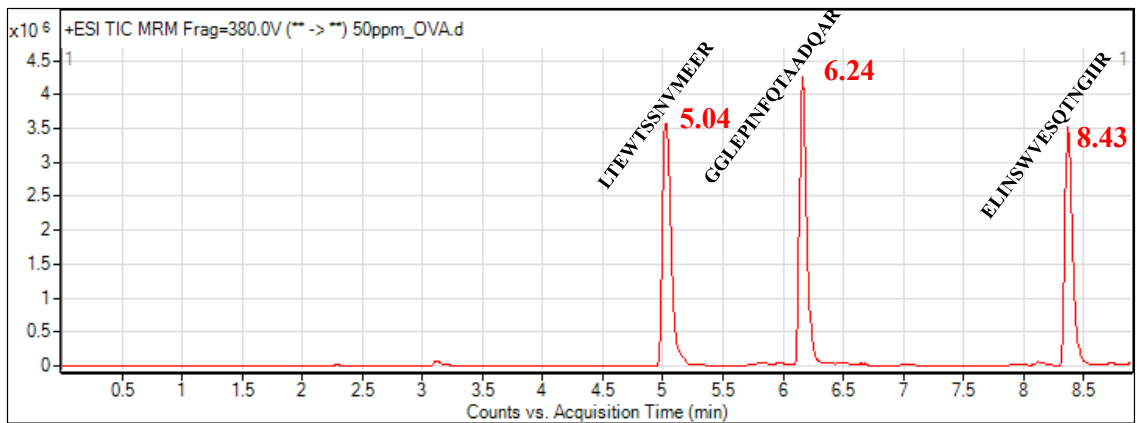
表三、雞蛋蛋白中蛋白質身分鑑定分析結果

NCBI nr Accession #	Coverage %	Protein MW (Da)	Species	Protein
1351295	55.0	79600.9	<i>Gallus gallus</i>	Ovotransferrin
129293	54.4	43222.8	<i>Gallus gallus</i>	Ovalbumin
223464	44.6	21224.1	<i>Gallus gallus</i>	Ovomucoid
229157	51.9	14770.3	<i>Gallus gallus</i>	Lysozyme
45383093	21.1	22549.2	<i>Gallus gallus</i>	Ovoglycoprotein
71895337	8.6	54429.2	<i>Gallus gallus</i>	Ovoinhibitor precursor

表四、雞蛋卵白蛋白中蛋白質身分鑑定胜肽序列及MRM transition parameters

Protein name	Peptide sequence	Precursor ion (m/z) (Charge state)	Product ion (m/z)	RT (min)	CE (eV)
卵白蛋白 (Ovalbumin)	GGLEPINFQTAADQAR	844.4 (+2)	1331.7	6.24	31
			1121.5		31
	ELINSWVESQTNGIIR	930.0 (+2)	1116.6	8.43	29
			1017.5		37
	LTEWTSSNVMEER	791.4 (+2)	1052.5	5.04	25
			951.4		25

RT: Retention time; CE: Collision energy.



圖二、雞蛋卵白蛋白利用液相層析串聯三段式四極桿質譜儀分析之MRM圖譜

格，每一個的數據都是由平均數正負標準差的形式表示 ( $\text{Mean} \pm \text{SD}$ )，各濃度的N等於5。

#### (一)離子對滯留時間

分析物經由分析管柱與移動相之間的交互作用下，會以不同的層析時間被沖提出來，每個標的皆有其專一的滯留時間。如表五所示，卵白蛋白之專一性胜肽GGLEPINFQTAADQAR、ELINSWVESQTNGIIR及LTEWTSSNVMEER的不同產物離子之層析時間誤差皆小於0.1分鐘。

#### (二)離子對訊號雜訊比

比較分析物訊號的強度與背景雜訊的強度。當背景雜訊過強時，會將分析物訊號埋沒，此為基質效應。其規範為定量離子必須大於10，定性離子必須大於3。根據表五所示，卵白蛋白之專一性胜肽GGLEPINFQTAADQAR、ELINSWVESQTNGIIR及LTEWTSSNVMEER之定量離子之訊號雜訊比大於10，定性離子也大於3。

#### (三)離子比率

離子比率是指以定性離子對波峰面積與定量離子對波峰面積相除而得之百分比，可顯示定性離子與定量離子之間的相對強

度，以確保檢測出的離子強度不是由基質中的其他物質干擾所產生的。由於目前沒有參考規範是關於蛋白質專一性胜肽之確效試驗，所以先以 SANTE/12682/2019 規範內的同一序列標準品的平均離子比率  $\pm 30\%$  以內為判斷基準，確保後續的確效試驗都可落於此規範內。根據表格顯示，卵白蛋白之專一性胜肽 (GGLEPINFQTAADQAR) 的兩個定性離子與定量離子之百分比各濃度皆介於平均離子比率  $\pm 30\%$  之間 (表五)。

#### (四)同日間評估

重複性是指於相同分析日期執行3重複以上的試驗，其規範為各個濃度的變異係數 (CV) 必須小於20%。本研究以卵白蛋白標準品添加於兩種基質進行方法測試，基質為全素餅乾時，添加卵白蛋白濃度2 ppm及40 ppm，其CV分別為3.08%及3.03%；基質為全素豆干時，添加卵白蛋白濃度2 ppm及20 ppm，其CV分別為4.23%及2.87%。

#### (五)異日間評估

中間精密度是指於不同分析日期將重複性的三重複執行3次以上，其規範為各濃度的變異係數 (CV) 必須小於20%。以

表五、卵白蛋白所選定胜肽之定性確效試驗-離子對滯留時間、訊雜比、離子比率

Protein name	Peptide sequence	Mass transition (m/z)	Retention time (min)	Signal/noise ratio	Ion ratio (%)
卵白蛋白 (Ovalbumin)	GGLEPINFQTAADQAR	844.4→1331.7 844.4→1121.5	6.07 ± 0.01	>10	93.61 ± 4.06
	ELINSWVESQTNGIIR	930.0→1116.6 930.0→1017.5	8.27 ± 0.01	>10	97.75 ± 6.88
	LTEWTSSNVMEER	791.4→1052.5 791.4→951.4	4.94 ± 0.01	>10	78.08 ± 5.93

The data were represented as Mean ± SD (N=5).

三、(四)檢體進行異日間評估，基質為全素餅乾時，添加卵白蛋白濃度2 ppm及40 ppm，其CV分別為9.74%及12.49%；基質為全素豆干時，添加卵白蛋白濃度2 ppm及20 ppm，其CV分別為11.50%及7.79%。

#### 四、市售產品之定性分析

本實驗購買10件餅乾類與7件豆干類素食產品進行質譜定性方法測試，依外包裝之成分、過敏原、素食標示，測試之產品，包含添加雞蛋之產品與無添加雞蛋之產品。依據定性確效分析項目進行判定。除此之外，每個檢體須於同一個分析日期進行3重複以上的試驗，確認實驗之重複性。最後將多樣化市售素食產品檢測雞蛋成分之結果進行總整理(表六)，結果顯示，在卵白蛋白的檢測中，10件餅乾類產品可檢測到4件產品含有卵白蛋白，7件豆干類產品共可檢測到3件產品含有卵白蛋白。

#### 五、定性確效分析之探討

本實驗首次完整的將蛋白質胜肽之定性確效分析試驗執行完成，本研究參考歐盟與食藥署食品化學檢驗方法之確效規範<sup>(17)</sup>做為基準，再將確效規範參數進行微調，以期訂定符合蛋白質專一性胜肽之確效規範。實驗結果顯示離子對滯留時間以及訊號雜訊比皆符合參考規範。離子比率方面目前食藥署食品化學檢驗方法之確效規範<sup>(17)</sup>，規定每個化學分子依據其不

同的離子比率，會有不同的容許範圍，而歐盟最新SANTE/12682/2019<sup>(10)</sup>內之規範則說明所有離子比率的容許範圍皆為同一序列標準品的平均離子比率 ± 30%以內，最終將食藥署以及歐盟之規範取其交集，發現檢測出的數值皆符合歐盟與食藥署參考規範。

#### 六、檢驗方法之公開

本研究已撰寫「食品中雞蛋卵白蛋白之檢驗方法」，並公開於食藥署官網。

### 結 論

表六、市售產品之雞蛋卵白蛋白定性分析

小麥類產品(餅乾)			黃豆類產品(素食)		
樣品種類	包裝警語	檢驗結果	樣品種類	包裝警語	檢驗結果
蛋捲	蛋	檢出	麥克雞塊	蛋	檢出
牛奶餅	蛋	檢出	胡椒牛排	蛋	檢出
蛋黃派	蛋	檢出	素火腿	蛋	檢出
雞蛋麵	蛋	檢出			
玉米片	無	未檢出	五香豆干	無	未檢出
千層派	無	未檢出	火腿片	無	未檢出
洋芋片	無	未檢出	乳酪棒	無	未檢出
米果	無	未檢出	烏魚子	無	未檢出
夾心餅乾	無	未檢出			
蘇打餅乾	無	未檢出			



本研究建立以液相層析串聯質譜分析方法，檢測食品中雞蛋卵白蛋白之檢驗方法。在卵白蛋白之確效試驗中，依據食藥署食品化學檢驗方法之確效規範<sup>(17)</sup>及歐盟標準，結果顯示選定之專一性胜肽各個參數皆符合參考規範，並且測試多樣化市售產品，確認此方法可實際應用於食品檢驗，且具有高度重複性與可信度。利用質譜儀檢測雞蛋過敏原含量具有高準確、高靈敏且高穩定性之優點，可增進國內檢測食品過敏原成分之能力。

### 參考文獻

1. Azarnia, S., Boye, J.I., Mongeon, V.J. and Sabik, H. 2013. Detection of ovalbumin in egg white, whole egg and incurred pasta using LC-ESI-MS/MS and ELISA. *Food Res. Int.* 52: 526-534.
2. Downs, M.L. and Johnson, P. 2017. Target selection strategies for LC-MS/MS food allergen methods. *J AOAC Int.* doi: 10.5740/jaoacint.17-0404.
3. Koeberl, M., Clarke, D. and Lopata, A.L. 2014. Next generation of food allergen quantification using mass spectrometric systems. *J. Proteome Res.* 13: 3499-3509.
4. Monaci, L., Losito, I., De Angelis, E., Pilolli, R. and *et al.* 2013. Multi allergen quantification of fining related egg and milk proteins in white wines by high resolution mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27: 2009-2018.
5. Parker, C.H., Khuda, S.E., Pereira, M., Ross, M.M. and *et al.* 2015. Multi-allergen quantitation and the impact of thermal treatment in industry-processed baked goods by ELISA and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 63: 10669-10680.
6. Planque, M., Arnould, T., Delahaut, P., Renard, P. and *et al.* 2019. Development of a strategy for the quantification of food allergens in several food products by mass spectrometry in a routine laboratory. *Food Chem.* 274: 35-45.
7. Roberts, D., Duque, S.U., Fernández-Alba, A. and Silcock, P. 2016. Routine quantitative method of analysis for pesticides using GC orbitrap mass spectrometry in accordance with SANTE/11945/2015 Guidelines. Thermo Scientific. Application note no. 10509.
8. 行政院衛生署。2008。包裝食品宣稱為素食之標示規定。衛署食字第 0970402575 號。
9. National Food Administration. 2009. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. SANCO/10684/2009.
10. European Commission. 2019. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. SANTE/12682/2019.
11. Tolin, S., Pasini, G., Simonato, B., Mainente, F. and *et al.* 2012. Analysis of commercial wines by LC-MS/MS reveals the presence of residual milk and egg white allergens. *Food Control* 28: 321-326.
12. Van Eeckhaut, A., Lanckmans, K., Sarre, S., Smolders, I. and *et al.* 2009. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 877: 2198-2207.
13. Yuan, M., Feng, C., Wang, S., Zhang, W. and *et al.* 2017. Selection of possible signature peptides for the detection of bovine lactoferrin in infant formulas by LC-MS/MS. *PLoS One.* 12: e0184152.

14. Planque, M., Arnould, T. and Gillard, N. 2017. Food allergen analysis: detection, quantification and validation by mass spectrometry. *Allergens*. pp. 7-41. Intech. Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia.
15. Mikołajczak, B., Fornal, E. and Montowska, M. 2019. LC-Q-TOF-MS/MS identification of specific non-meat proteins and peptides in beef burgers. *Molecules* 24: 18.
16. General European OMCL Network (GEON). 2016. Interpretation of screening results for unknown peptides and proteins by mass spectrometry based methods. PA/PH/OMCL (15) 04 2R.
17. 衛生福利部食品藥物管理署。2013。食品化學檢驗方法之確效規範。[<http://www.fda.gov.tw/TC/siteList.aspx?sid=4115>]。

## Method of Test for Ovalbumin from Chicken Eggs in Foods

YUNG-HSIANG WENG, CHEN-CHU WANG, HSING-CHIH WU,  
HSIU-WEI TSUEI, CHE-YANG LIN, YA-MIN KAO,  
SU-HSIANG TSENG AND DER-YUAN WANG

Division of Research and Analysis, TFDA

### ABSTRACT

Food safety has always been an issue that continues to attract regulator's attention. In order to strengthen food allergen labeling, eleven major food allergens were required to be labeled and emphasized in the reference of international standards and the clinical investigation data. Among food allergens, egg is one of the major food allergens. Previous studies successfully found that liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC/Q-TOF MS) can be applied in the detection of ovalbumin which was the major allergenic protein of egg. Then, liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (LC/QqQ MS) was used to test and validate for the determination of the target peptides of ovalbumin in different processing products. The results showed that the retention time, signal/noise (S/N) ratio, and ion ratios were all complied. The limit of detection was 2 ppm. A survey consisted of 17 commercial products containing egg was conducted and the ovalbumin was tested by the developed LC/QqQ MS method. The results showed all products complied with their labeling. This LC/QqQ MS method offered high accuracy, high sensitivity and stability for the detection of egg allergen in foods.

Key words: allergen, ovalbumin, LC/MS/MS, egg