

超声辅助酶解与串联质谱联用检测阿胶中马皮成分

蔡朔¹, 蒋梦彤¹, 赵珂璇¹, 韩疏影¹, 费菲², 曹蓓², 赵明^{1,3}, 段金廛^{1,3}, 刘睿^{1,3,4}

(1.南京中医药大学药学院,江苏南京 210023;2.南京鼓楼医院 I 期临床试验室,江苏南京 210008;3.南京中医药大学江苏省中药资源产业化过程协同创新中心/中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心,江苏南京 210023;4.江苏省海洋药用生物资源研究与开发重点实验室,江苏南京 210023)

摘要:目的 超声辅助快速酶解与串联质谱联用实现准确、高效检测阿胶中的马皮成分,为阿胶质量标准研究提供实验依据。
方法 采用超声辅助胰蛋白酶酶解的方法,快速制备阿胶酶解液样品,采用超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱(UPLC-QQQ-MS)对阿胶酶解液进行检测,在电喷雾离子化的正离子模式下,多反应监测模式(MRM),以驴专属肽 m/z 691.0→809.4、马专属肽 m/z 698.3→809.4 为离子对,检测阿胶样品中的马专属肽,以及驴专属肽与马专属肽的相对峰面积比例。
结果 采用的方法可在 20 min 内准确判别阿胶中是否掺有马皮成分,及掺入的马皮成分的比例,马皮成分的检出限为 1%。
结论 超声辅助快速酶解与串联质谱联用的方法准确可靠、专属性强、检测效率高,可用于阿胶中马皮成分的快速检测。

关键词: 阿胶;马皮成分;超声辅助酶解;串联质谱;专属肽

中图分类号: R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-0482(2020)05-0623-06

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2020.0623

引文格式: 蔡朔, 蒋梦彤, 赵珂璇, 等. 超声辅助酶解与串联质谱联用检测阿胶中马皮成分[J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(5): 623-628.

Detection of Horse-Hide Gelatin in Asini Corii Colla by Using Ultrasonic Assisted Enzyme Digestion Combined with Tandem Mass Spectrometry Method

CAI Shuo¹, JIANG Meng-tong¹, ZHAO Ke-xuan¹, HAN Shu-ying¹, FEI Fei², CAO Bei², ZHAO Ming^{1,3}, DUAN Jin-ao^{1,3}, LIU Rui^{1,3,4}

(1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China; 2. Phase I Clinical Trials Unit, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing, 210008, China; 3. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, and National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China; 4. Jiangsu Key Laboratory of Research and Development in Marine Bio-Resource Pharmaceuticals, Nanjing, 210023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To accurately and efficiently detect the horse hide components in Asini Corii Colla (ACC) by using ultrasonic assisted fast enzyme digestion and tandem mass spectrometry, and provide experimental basis for ACC quality standard investigation. **METHODS** By using ultrasonic assisted trypsin digestion method, ACC hydrolysate samples were prepared rapidly. High performance liquid chromatography with three quadrupole mass spectrometry was used to detect the ACC hydrolysate samples. Under positive electrospray ionization mode and multiple reaction monitoring (MRM), donkey-specific peptide (Pep-1) with ion pair of m/z 691.0 → 809.4 and horse-specific peptide (Pep-2) with ion pair of m/z 698.3 → 809.4 were used to detect Pep-2 in ACC, and the relative peak area ratio between Pep-2 and Pep-1. **RESULTS** This method could be used to determine if there was horse-hide gelatin (HHG) in ACC within 20 min, and the proportion of HHG in ACC. The detection limit of HHG adulteration was low to 1%. **CONCLUSION** Ultrasound-assisted fast enzyme digestion combined with tandem

收稿日期: 2020-08-26

基金项目: 国家自然科学基金(81973450);国家重点研发计划(2018YFC1706100);江苏省高校“青蓝工程”优秀青年骨干教师(2016年);江苏省“333工程”第三层次(2016年);中华中医药学会“青年人才托举工程”

第一作者: 蔡朔,男,E-mail:2961748012@qq.com

通信作者: 刘睿,男,副研究员,从事动物药资源化学研究,E-mail:liurui@njucm.edu.cn;

段金廛,男,教授,主要从事中药资源化学与资源循环利用研究,E-mail:dja@njucm.edu.cn

mass spectrometry showed good accuracy, reliability, specificity and efficiency, and can be used for the rapid detection of HHG in ACC.

KEYWORDS: *Colla corii asini*; horse-hide gelatin; ultrasonic assisted enzyme digestion; tandem mass spectrometry; species-specific peptides

阿胶(*Asini Corii Colla*)为马科动物驴 *Equus asinus* L.的干燥皮或鲜皮经煎煮、浓缩制成的固体胶。具补血滋阴,润燥,止血之功^[1]。阿胶的应用逾 2 000 年历史,《神农本草经》将阿胶列为上品。一直以来,阿胶作为药食同源中药,在中医临床与保健食品等方面应用广泛。

阿胶需求量有增无减,使得阿胶原料用量急速增长,阿胶及原料的价格也日渐高涨,部分不法企业为获得高额收益,用牛皮、猪皮、马皮、骡皮等原料制备阿胶以次充好^[2]。现阶段,基于串联质谱检测专属肽类成分的方法成为阿胶真伪鉴别的关键技术手段之一,如驴源、马源、牛源、鹿源等专属肽的发现与应用,通过检测不同物种专属肽的离子对是否存在来判断掺杂情况已成为胶类药材成熟的质控方法^[3-7]。目前 2020 年版《中国药典》即通过检测驴源多肽实现阿胶的鉴别与含量测定。

然而,在基于专属肽段检测的阿胶及胶类药材的质控方法中,样品前处理需采用胰蛋白酶对胶类药材溶液进行酶解过夜或 12 h 以上,极大限制了胶类药材的检测分析效率。为此,本文采用超声辅助酶解的方法,显著缩短阿胶药材的酶解时间,提升了前处理效率;并在此基础上,采用三重四极杆质谱分析比较驴源专属肽与马源专属肽相对含量比值,判断阿胶样品掺入马皮的比例,实现阿胶中马皮成分的快速、准确、灵敏的检测,为阿胶乃至胶类药材的质量评价研究提供理论支撑,具有良好的应用价值。

1 材料

Nexera UPLC LC-20A 液相系统(日本岛津公司);AB Sciex 5500 Plus 三重四级杆质谱仪(美国 AB Sciex 公司);BP 211D 电子天平(德国 Sartorius 公司);超声机(昆山超声仪器有限公司, KQ-500DE);离心机(德国 Sigma 公司, 3-16PK);离心浓缩仪(美国 Labconco 公司)。

胰蛋白酶(Promega 质谱测序级),乙腈、甲醇、甲酸等质谱用试剂均为质谱级(德国 Merck 公司);磷酸盐缓冲液(PBS,美国 GE 公司);纯净水为 Milli-Q 纯水;2 批马皮样品与 2 批骡皮样品为市面收集;4 批市售阿胶(ACC)样品由市面购得。

肽 1(HGDRGEH_{yp}GPVGSVGPVGA VGPR)为驴源专属肽段,肽 2(HGHRGEH_{yp}GPVGSVGPVGA VGPR)为马源专属肽段,肽 3(GEH_{yp}G-PVGSVGPVGA VGPR)为驴和马共有肽段,由金斯瑞生物科技股份有限公司合成,其中 H_{yp} 表示羟脯氨酸,纯度>95%。

2 方法

2.1 胶类样品的制备与酶解

取马皮、骡皮上随机切割下的皮,每块皮剪至 3.0 cm×3.0 cm 大小,充分浸泡 5~7 d,经过焯皮、洗皮、高温熬制化皮(温度为 117~120 ℃)后,除去皮渣和油脂,将熬制液合并,提沫、浓缩、干燥后得到马皮胶(HHG)与骡皮胶(MHG)样品。

参照 2020 年版《中国药典》的方法,稍作修改,取 ACC、HGG、MHG 样品约 10 mg,加 50 mmol/L PBS 5 mL,超声处理 30 min,得不同胶的溶液,12 000 r/min 离心 20 min,取上清液 150 μL,置于 2 mL 离心管中,以 1 mL 50 mmol/L PBS 稀释,加入适量胰蛋白酶,摇匀,37 ℃ 恒温或超声酶解,加入 10% TFA 溶液 60 μL 终止反应,12 000 r/min 离心 20 min,即得不同胶的酶解液,置于-20 ℃ 保存,备用。

2.2 LC-MS/MS 分析

UPLC-QQQ-MS 分析不同胶酶解液的专属肽段,采用多反应监测(MRM)确定待测样品中是否存在专属肽信息。液相条件为:岛津 Nexera UPLC LC-20A 液相系统,色谱柱为 1.7 μm Waters C₁₈ 柱(2.1 μm×100 mm),上样量为 2 μL,流速 0.3 mL/min,流动相 A(乙腈),流动相 B(0.1% 甲酸),0~3.5 min,10~30% A;3.5~4 min,30~10% A;4~6 min,10% A。质谱系统为 AB Sciex QTRAP 5500 Plus 三重四级杆质谱,电喷雾正离子模式(ESI⁺),质谱参数为:离子源温度 500 ℃;电离电压 5 500 V;脱溶剂温度 500 ℃;离子源气体 1,0.417 MPa;离子源气体 2,0.417 MPa。

质谱条件优化:根据高分辨质谱给出的碎片离子信号,选取响应值较高的 2 个碎片离子作为离子对,选定的离子对在三重四极杆质谱仪上优化去簇

电压(DP)值与碰撞能量(CE)值参数,使离子对响应值最高。

2.3 酶解条件优化

将 ACC 样品按“2.1”项下步骤酶解时,采用不同酶解条件处理样品,以肽 1 与肽 3 的峰面积为指标,比较不同酶解条件,以优化酶解方法。

①在 37 °C 恒温水浴条件下,选择不同酶解时间:2、4、6、12 h;②在超声条件下,选择不同酶解时间:1、5、10、20、30、45、60 min;③采用超声酶解 10 min 的方法,选择不同加酶量(w/v):0.1%、0.2%、0.5%、1%、2%。获得的 ACC 酶解液样品按“2.2”项下分析方法检测肽 1 与肽 3 峰面积及变化趋势。

HHG 与 MHG 样品按“2.1”项下步骤酶解,选择不同超声酶解时间:1、5、10、20、30、45、60 min,获得的 HHG 与 MHG 酶解液按“2.2”项下分析方法检测肽 1、肽 2 与肽 3 峰面积及变化趋势。

2.4 不同比例混合的 HHG/ACC、MHG/ACC 样

品的检测

分别将 HHG 溶液与 ACC 溶液、MHG 溶液与 ACC 溶液按照 1%、5%、10%、20%、50%、80%、90%、95%、99% 的比例混合,12 000 r/min 离心 20 min,分别取不同混合比例样品的上清液 150 μ L,置于 2 mL 离心管中,以 1 mL 50 mmol/L PBS 稀释,加入 1% 胰蛋白酶(w/v),摇匀,超声酶解 10 min,加入 10% TFA 溶液 60 μ L 终止反应,12 000 r/min 离心 20 min,即得不同混合比例样品酶解液,置于 -20 °C 保存,备用。

取 4 批市售 ACC 样品,按“2.1”项下处理方法,其中胰蛋白酶加入量为 1%,超声酶解时间为 10 min,终止反应后 12 000 r/min 离心 20 min,得 4 批市售 ACC 样品酶解液,置于 -20 °C 保存,备用。

3 结果

3.1 流程示意图

检测流程如图 1 所示,本方法可在 20 min 内完成阿胶样品中马皮成分的检测。

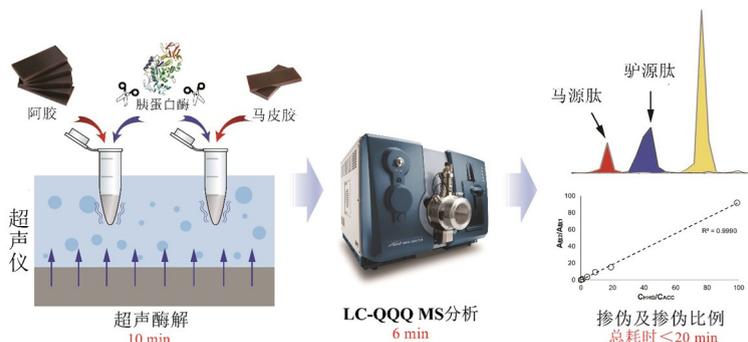


图 1 快速酶解与串联质谱联用检测流程示意图

3.2 肽 1、肽 2 的质谱参数优化与专属性验证

获得最优离子对相应,优化后的 DP 与 CE 参数如表 1 所示。

通过 MRM 模式确定肽 1 与肽 2 的离子对。为

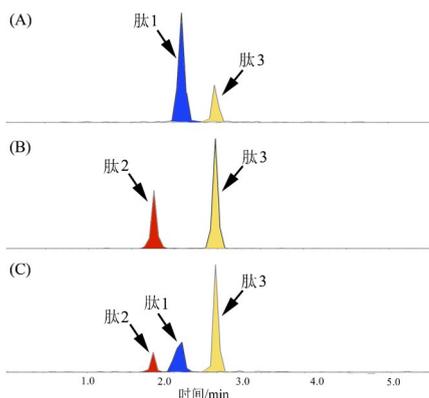
表 1 肽 1、肽 2 与肽 3 的质谱参数

肽段	氨基酸序列	离子对	DP/V	CE/V
肽 1	HGDRGEH _{yp} GPVGSVGPVGA VGPR	m/z 691.0(3+)→809.4(y_9^+)	91.35	34.43
肽 2	HGHRGEH _{yp} GPVGSVGPVGA VGPR	m/z 698.3(3+)→809.4(y_9^+)	99.73	37.84
肽 3	GEH _{yp} GPVGSVGPVGA VGPR	m/z 803.1(2+)→710.0(y_{16}^{2+})	29.62	17.05

有研究表明,驴和马的 I 型胶原蛋白 $\alpha 2$ 链(COL1A2)上共有 4 个不同的氨基酸位点,肽 1 与肽 2 为源于 COL1A2 的⁷⁸¹His~⁸⁰²Arg 同源肽段,肽 1 为驴源专属肽^[8],肽 2 则为马源专属肽;理论上说,肽 1 与肽 2 在胰蛋白酶的作用下,N-端的 4 个氨基酸会被切割而生成肽 3,因 N-端的 4 个氨基酸含有驴和马的差异氨基酸位点,因而肽 3 已不具有专属性。

将 ACC、HHG 及 MHG 酶解液样品按“2.2”项

下方法及表 1 中优化的质谱参数设置检测,结果如图 2 所示,ACC 样品可检测到肽 1 与肽 3,HHG 可检测到肽 2 与肽 3,由于骡是驴和马的杂交产物,MHG 样品可同时检测到肽 1、肽 2 与肽 3。结果表明肽 1 与肽 2 具有较好的专属性,可用于区分 ACC 与 HHG。



A.ACC 样品;B.HHG 样品;C.MHG 样品

图 2 不同胶样品专属肽检测

3.3 酶解方法优化

为提高 ACC 酶解液的制备效率,对不同的酶解方法进行比较和优化。ACC 样品在 37 °C 恒温水

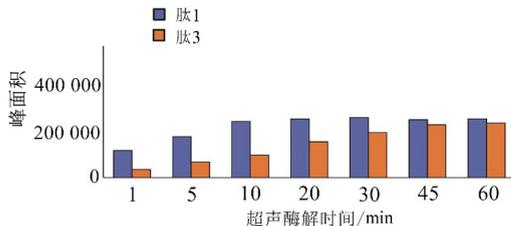
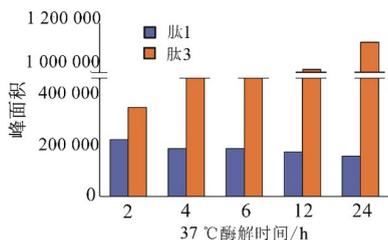


图 3 ACC 样品不同酶解方式比较

浴酶解与超声酶解条件下,肽 1 与肽 3 峰面积在不同处理时间下的变化趋势见图 3。37 °C 恒温水浴酶解条件下,随着酶解时间的延长,肽 1 的峰面积有小幅下降,肽 3 的峰面积显著上升,部分肽 1 可能发生降解生成了肽 3;超声酶解条件下,随着超声时间的延长,肽 1 的峰面积显著提升,在超声 10~20 min 时间后,肽 1 峰面积变化不显著。比较 2 种酶解条件下肽 1 随处理时间的变化趋势来看:①37 °C 恒温水浴酶解 2 h 为最佳酶解时间,此时肽 1 峰面积最大,肽 3 峰面积最小;②超声酶解 10 min 为最佳酶解时间,此时肽 1 峰面积基本接近最大值,而肽 3 峰面积远低于肽 1,肽 1 转化成肽 3 的相对量较低;③37 °C 恒温水浴酶解 2 h 与超声酶解 10 min 时,肽 1 的峰面积相当。因此,超声辅助酶解可作为胶类样品的前处理酶解方法,酶解时间为 10 min 即可。

下的肽 1、肽 2 与肽 3 峰面积变化趋势见图 5。HHG 样品经超声酶解处理后,可检测出肽 2 与肽 3,而 MHG 样品经超声酶解处理后,可同时检测出肽 1、肽 2 与肽 3。HHG 样品的肽 2,及 MHG 样品的肽 1、肽 2 峰面积在超声酶解 10 min 达峰值,表明对 HHG 与 MHG 样品而言,超声酶解 10 min 亦为最优时间。

综上,可确定超声辅助酶解的条件为:胰蛋白酶的加酶量为 1%,超声酶解 10 min。

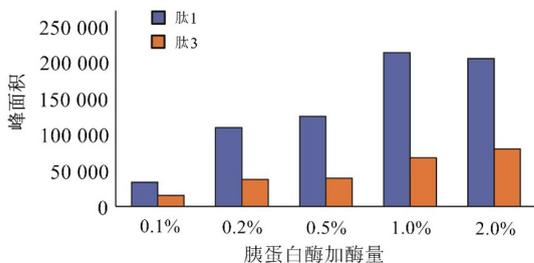
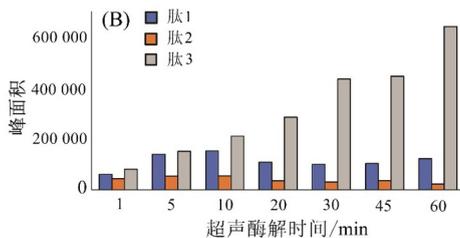
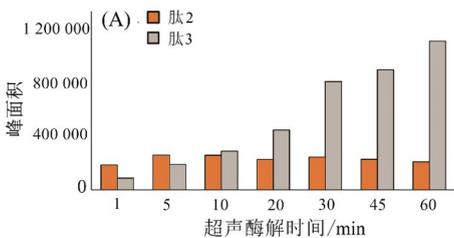


图 4 ACC 样品加酶量考察

HHG 与 MHG 样品在不同超声酶解时间处理



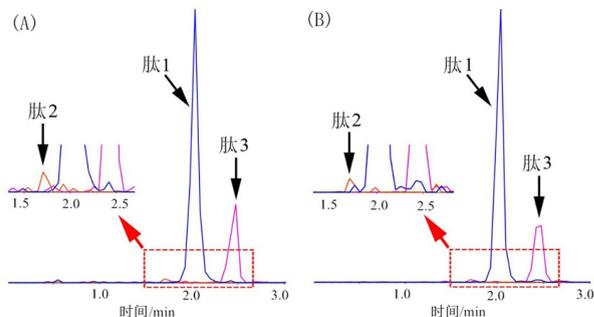
注:A.HHG 样品;B.MHG 样品

图 5 HHG 与 MHG 不同超声酶解时间的比较

3.4 HHG/ACC 与 MHG/ACC 混合样品的检测
在不同掺杂比例的 HHG/ACC、MHG/ACC

样品中均可检测到肽 1 与肽 2 的峰,在 1% 的 HHG/ACC 掺杂样品中可检出肽 2,表明该方法灵

敏度良好,阿胶中掺入马皮的检出限为1%;在MHG/ACC样品中,由于骡皮同时含有肽1与肽2,肽2的相对含量较低,仅5%的掺杂样品可检测出肽2,而1%的掺杂样品未检测出肽2。见图6。



注:A.1%HHG/ACC样品;B.5%MHG/ACC样品

图6 混胶样品 XIC 图

结果见表2~3。根据不同比例HHG/ACC混合样品的肽1与肽2的峰面积,以混胶样品中HHG与ACC相对含量的比值(C_{HHG}/C_{ACC})为横坐标,以肽2峰面积与肽1峰面积的比值($A_{肽2}/A_{肽1}$)为纵坐标作图,如图7A所示, C_{HHG}/C_{ACC} 与 $A_{肽2}/A_{肽1}$ 呈线性, $A_{肽2}/A_{肽1} = 0.9242(C_{HHG}/C_{ACC}) - 0.1753$, $R^2 = 0.9990$ 。表明ACC掺入HHG的比例与肽1与肽2峰面积相关,因此可根据 $A_{肽2}$ 与 $A_{肽1}$ 的比例关系确定阿胶中掺入马皮的比例。

由于MHG中同时存在肽1与肽2,为了确定阿胶中掺入骡皮的比例,应从MHG/ACC混合样品中扣除源于MHG的肽1后,建立与肽2峰面积的关系,MHG中 $A_{肽2}/A_{肽1}$ 是常数,约为0.408,根据MHG中 $A_{肽2}$ 与 $A_{肽1}$ 关系,修正MHG/ACC混合样品中肽1的峰面积 $A_{肽1}' = A_{肽1} - (A_{肽2}/0.408)$,以(C_{MHG}/C_{ACC})为横坐标,以($A_{肽2}/A_{肽1}'$)为纵坐标作图,图7B表明线性关系良好, $R^2 = 0.9837$ 。表明通过修正 $A_{肽1}$ 也可以计算出阿胶中掺入骡皮的比例。

表2 ACC掺入HHG的比例与肽2/肽1比例的关系

比例/%	C_{HHG}/C_{ACC}	$A_{肽1}$	$A_{肽2}$	$A_{肽2}/A_{肽1}$
99	0.010	297 671	3 829	0.013
95	0.053	211 096	11 025	0.038
90	0.111	246 373	30 435	0.124
80	0.25	292 782	64 974	0.308
50	1	140 464	115 528	0.822
20	4	61 012	223 639	3.665
10	9	22 249	205 078	9.218
5	19	17 099	256 920	15.025
1	99	2 773	254 190	91.671

表3 ACC掺入MHG比例与肽2/肽1比例的关系

比例/%	C_{MHG}/C_{ACC}	$A_{肽1}$	$A_{肽2}$	$A_{肽1}' = A_{肽1} - (A_{肽2}/0.408)$	$A_{肽2}/A_{肽1}'$
99	0.010	329 483	1 849	324 952	0.006
95	0.053	285 989	2 377	280 163	0.008
90	0.111	226 383	8 120	206 479	0.039
80	0.25	204 279	10 167	179 360	0.057
50	1	178 538	14 788	142 292	0.104
20	4	183 674	37 899	90 785	0.417
10	9	161 733	37 704	69 321	0.544
5	19	110 998	39 615	13 902	2.842
1	99	120 513	47 079	5 124	9.107

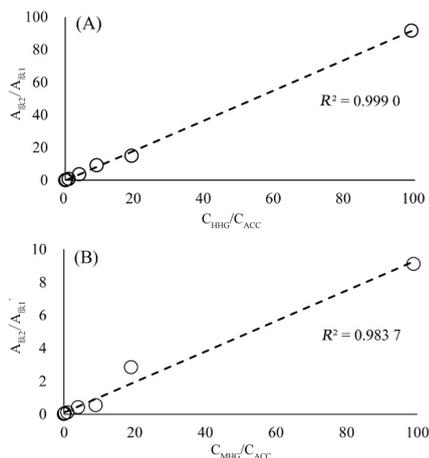


图7 ACC掺入HHG比例(A)及ACC掺入MHG比例(B)与肽2/肽1比例的线性关系图

3.5 市售ACC样品的检测

对采集的4批市售阿胶样品进行检测,结果见表4,其中2批样品未检测到肽2,表明无马皮掺杂,为阿胶正品;1批样品未检测到肽1,表明该批样品为马皮胶,为阿胶伪品;1批样品同时检测到肽1与肽2,根据两者峰面积比可计算出该样品中马皮掺入量约为38.0%,亦为阿胶伪品。

表4 市售阿胶样品检测

样品	$A_{肽1}$	$A_{肽2}$	$A_{肽2}/A_{肽1}$	C_{HHG}/C_{ACC}	马皮掺伪比例/%
阿胶1	275 988	—	—	—	0
阿胶2	319 482	—	—	—	0
阿胶3	—	236 382	—	—	100
阿胶4	120 513	47 079	0.391	0.612	38.0

4 讨论

近年来,基于串联质谱检测专属肽类成分被广泛应用于胶类药材真伪优劣的判别。相比于DNA条形码技术,专属肽类的检测方法更适合于经过高温、高压熬制处理后的胶类药材^[9]。通过高通量、高

分辨、高灵敏度质谱检测的方法,可用于鉴别胶类药材的专属性肽类成分不断被发现与应用^[2-3,5,7]。然而,传统的蛋白酶酶解获得专属性肽的前处理方法需要长时间酶解,限制了胶类药材鉴别、含量测定等研究的通量。

有研究报道,超声辅助酶解^[10]、微波辅助酶解^[11]及酶固定化技术^[12]均可加快蛋白酶酶解效率,在文献报道的探针式超声辅助快速酶解基础上,本文采用水浴式超声仪,同样可获得不错的酶解效率。超声辅助酶解相较于微波辅助酶解与酶固定化技术,方法更简单,操作更可控。从文中数据可见,超声辅助酶解 10 min 与 37 °C 恒温酶解 2 h 生成的肽 1 量相当,而产生的肽 3 量则比恒温酶解 2 h 少很多。肽 3 产生途径主要有两方面,一是 COL1A1 在胰蛋白酶作用下释放肽 3,另一个是在胰蛋白酶的长时间酶解下,肽 1 或肽 2 进一步降解产生肽 3,为了更准确鉴别胶类样品,应保证肽 1 与肽 2 的量的同时尽可能减少肽 3 的产生,因此,超声辅助酶解 10 min 符合本文实验要求。

本文的研究将超声辅助酶解与串联质谱联用,以专属性肽判断真伪,以专属性肽峰面积比例确定掺假量,实现 20 min 内完成分析操作的同时,准确判断阿胶的真伪及马皮掺入量。本文研究为阿胶质量控制提供了新的思路,本文的方法也可引申至胶类药材的质量控制中,建立准确、可靠、高效、专属性强的胶类动物药质量控制模式与方法。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].北京:中国医药科技出版社,2020:197-198.
- [2] 张静娴,胡青,董洪霜,等.超高效液相色谱-三重四级杆质谱法用

于阿胶糕类食品中阿胶的鉴别及马、牛、羊、猪皮源成分的检测[J].世界中医药,2019,14(4):828-832.

- [3] 焦阳,汪冰,周倩倩,等.超高效液相色谱-质谱联用技术检测阿胶中马皮源成分[J].药物分析杂志,2019,39(5):864-869.
- [4] 房芳,张九凯,马雪婷,等.基于特征肽段的阿胶中异源性物种鉴别[J].食品科学,2019,40(16):267-273.
- [5] 石峰,杭宝建,迟连利,等.驴皮特征肽的发现及其在阿胶鉴别中的应用[J].药物分析杂志,2017,37(12):2272-2278.
- [6] 巩丽萍,杭宝建,迟连利,等.马皮特征肽的发现及其在阿胶中马皮源成分检测中的应用[J].药物分析杂志,2018,38(2):364-369.
- [7] LIU R, HUANG Y, XU HK, et al. A strategy for identifying species-specific peptide biomarkers in deer-hide gelatin using untargeted and targeted mass spectrometry approaches[J]. Anal Chim Acta, 2019, 1092: 32-41.
- [8] 秦玉峰,周祥山,郝向慧,等.一种驴特征性多肽及其在检测驴皮源性成分中的应用:中国,CN201510649163.7[P]. 2016-02-03.
- [9] 程显隆,李明华,郭晓晗,等.胶类药材质量问题变化情况 & 标准研究对策[J/OL]. 中国现代中药[2020-08-15]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5442.R.20200725.1407.002.html>.
- [10] CARRERA M, CAÑAS B, LÓPEZ-FERRER D, et al. Fast monitoring of species-specific peptide biomarkers using high-intensity-focused-ultrasound-assisted tryptic digestion and selected MS/MS ion monitoring[J]. Anal Chem, 2011, 83(14): 5688-5695.
- [11] SUN W, GAO SJ, WANG LJ, et al. Microwave-assisted protein preparation and enzymatic digestion in proteomics[J]. Mol Cell Proteomics, 2006, 5(4): 769-776.
- [12] FAN C, SHI ZM, PAN YT, et al. Dual matrix-based immobilized trypsin for complementary proteolytic digestion and fast proteomics analysis with higher protein sequence coverage[J]. Anal Chem, 2014, 86(3): 1452-1458.

(编辑:杨巍敏)