ICS 67.100.10
CCS X 16

T/CS

团　　体　　标　　准

T/CS XXXX—XXXX

驼乳及驼乳粉真实性鉴别肽指纹图谱法

Identification of authenticity of camel milk and camel milk powder-peptide fingerprint method

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

中国商品学会　　发 布

目　　次

前　　言 III
1 范围 1
2 规范性引用文件 1
3 术语和定义 1
4 原理 1
5 试剂、材料与仪器设备 1
5.1 试剂 2
5.2 溶液配制 2
5.3 材料 2
5.4 仪器设备 2
6 样品制备 2
6.1 样品采集与保存 2
6.2 液态驼乳样品前处理 3
6.3 驼乳粉样品前处理 3
6.4 空白对照、参比样品同步处理 3
7 试验方法 3
7.1 蛋白还原与烷基化 3
7.2 蛋白酶解 3
7.3 酶解液净化 3
7.4 色谱条件 3
7.5 质谱条件 4
7.6 数据处理与肽段匹配 4
8 结果判定 4
8.1 骆驼源性成分的判定 4
8.2 非骆驼源性成分的判定 4
8.3 真实性结论 5
8.4 试验报告 5
9 方法学性能要求 5
9.1 特异性 5
9.2 检出限 5
9.3 重复性 5
9.4 确认要求 5
附　录　A　（规范性）　驼乳特征肽段及常见掺假乳源特征肽段参考表 6
A.1 驼乳特征肽段 6

A.2 牛乳特征肽段 6
A.3 羊乳特征肽段 6

前　言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则　第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由巴特乳业（新疆）有限公司提出。

本文件由中国商品学会归口。

本文件起草单位：巴特乳业（新疆）有限公司、内蒙古农业大学、西北农林科技大学、新疆农业大学、新疆生产建设兵团第九师骆驼产业推广协会、西安依巴特生物科技有限公司、内蒙古驼可汗乳业有限公司、新疆农垦科学院。

本文件主要起草人：白航、何静、赵欣怡、葛武鹏、江海元、明亮、斯仁达来、张九凯、李春、赵悦辰。

本文件首次发布。

驼乳及驼乳粉真实性鉴别肽指纹图谱法

1 范围

本文件规定了肽指纹图谱法鉴别驼乳及驼乳粉真实性的原理、试剂、材料与仪器设备、样品制备、试验方法、结果判定和方法学性能要求。

本文件适用于生驼乳、巴氏杀菌驼乳、灭菌驼乳、纯驼乳粉、调制驼乳粉中驼乳源性真伪鉴别。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 5009.1—2025 食品安全国家标准 理化检验 总则

GB 5009.5—2025 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定

GB/T 6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

肽指纹图谱 peptide fingerprint

样品总蛋白经特异性蛋白酶酶解，得到肽段混合物，经液相色谱-高分辨质谱采集，获得的包含肽段保留时间、精确质荷比、碎片离子信息的特征图谱集合。

3.2

特征肽段 signature peptide

来源于物种特异性乳蛋白，氨基酸序列具有物种唯一性，可作为物种鉴别标志物的酶解肽段，本文件分为驼乳特征肽段、异种掺假乳源特征肽段（牛乳、羊乳）。

3.3

参比样品 reference sample

经确证无掺假的纯驼乳、纯驼乳粉标准参比物质或溯源样品，用于同步试验、图谱比对。

3.4

检出限 limit of detection, LOD

在给定置信水平下，方法能够定性检出目标特征肽段的最低掺假比例。

4 原理

样品中乳总蛋白经提取、还原、烷基化，胰蛋白酶特异性酶解获得肽段混合物；肽段经超高效液相色谱分离，高分辨质谱采集得到肽指纹图谱；将待测样品肽指纹信息与纯驼乳参比样品、异种乳源参比样品的特征肽段库比对；根据是否检出非驼乳物种特征肽段，判定样品是否存在异种乳源掺入，实现驼乳及驼乳粉真实性鉴别。

5 试剂、材料与仪器设备

5.1 试剂

5.1.1 除非另有说明，所用试剂均为分析纯或以上等级，水为GB/T 6682—2008规定的一级水。
5.1.2 碳酸氢铵（NH_4HCO_3）：分析纯。
5.1.3 二硫苏糖醇（DTT）：生化试剂。
5.1.4 碘乙酰胺（IAA）：生化试剂。
5.1.5 胰蛋白酶（Trypsin）：质谱级，酶活性≥10000 BAEE units/mg。
5.1.6 甲酸（FA）：色谱纯。
5.1.7 乙腈（ACN）：色谱纯。
5.1.8 三氟乙酸（TFA）：色谱纯。
5.1.9 尿素：分析纯。

5.2 溶液配制

5.2.1 碳酸氢铵溶液（100 mmol/L）：称取7.9 g碳酸氢铵，加水溶解并定容至1000 mL。
5.2.2 二硫苏糖醇溶液（100 mmol/L）：称取1.54 g DTT，加碳酸氢铵溶液溶解并定容至100 mL。临用现配。
5.2.3 碘乙酰胺溶液（200 mmol/L）：称取3.70 g IAA，加碳酸氢铵溶液溶解并定容至100 mL。临用现配，避光保存。
5.2.4 胰蛋白酶溶液（1 mg/mL）：称取10 mg胰蛋白酶，加碳酸氢铵溶液溶解并定容至10 mL。临用现配。
5.2.5 甲酸水溶液（0.1%，体积分数）：量取1.0 mL甲酸，加水定容至1000 mL。
5.2.6 乙腈水溶液（0.1%甲酸，体积分数）：量取1.0 mL甲酸和适量乙腈，加水定容至1000 mL。

5.3 材料

5.3.1 超滤离心管：截留分子量10 kDa。
5.3.2 C_{18}固相萃取小柱：填料量10 mg～100 mg，柱体积1 mL～6 mL，或等效产品。使用前按说明书活化和平衡。
5.3.3 纯驼乳参比样品：经确证无掺假的纯驼乳或纯驼乳粉，具有可追溯的样品来源信息。
5.3.4 异种乳源参比样品：经确证的纯牛乳、纯山羊乳、纯绵羊乳样品，用于特征肽段库建立和比对。

5.4 仪器设备

5.4.1 超高效液相色谱仪：配备二元泵、自动进样器和柱温箱。
5.4.2 高分辨质谱仪：四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱仪或等效的高分辨质谱仪，分辨率≥70000（FWHM，m/z 200）。
5.4.3 分析天平：感量0.001 g和0.0001 g。
5.4.4 离心机：最高转速不低于12000 r/min，控温范围4 ℃～室温。
5.4.5 恒温振荡器：控温精度±1 ℃，转速范围0 r/min～1 500 r/min。
5.4.6 氮吹仪。
5.4.7 pH计：精度±0.01 pH单位。
5.4.8 色谱柱：C_{18}色谱柱，柱长100 mm，内径2.1 mm，填料粒径1.7 μm～1.8 μm，或等效色谱柱。

6 样品制备

6.1 样品采集与保存

6.1.1 样品采集应具有代表性，按GB 5009.1—2025的相关规定执行。
6.1.2 液态驼乳样品：采集后应于2℃～8℃冷藏保存，并在48 h内完成检测；若不能及时检测，应于-18℃以下冷冻保存，保存期不超过3个月。检测前于室温（20℃～25℃）解冻，轻轻混匀，避免剧烈振荡。
6.1.3 驼乳粉样品：应密封保存于阴凉干燥处，温度不超过25℃，相对湿度不超过65%。检测前恢复至室温。

6.1.4 样品应避免阳光直射、高温和反复冻融，防止蛋白变性和降解。。

6.2 液态驼乳样品前处理

6.2.1 取液态驼乳样品 5.0 mL（精确至 0.01 mL）于 50 mL 离心管中，加入 15 mL 预冷至 4 ℃的去离子水，充分混匀。
6.2.2 于 4 ℃条件下以 10000 r/min 离心 15 min，弃去上层脂肪层，保留脱脂乳清。
6.2.3 向脱脂乳清中加入预冷至-20 ℃的丙酮 20 mL，充分混匀，于-20 ℃静置 30 min 沉淀蛋白质。
6.2.4 于 4 ℃条件下以 12000 r/min 离心 15 min，弃去上清液，氮吹干燥沉淀。
6.2.5 将蛋白质沉淀溶于 100 mmol/L 碳酸氢铵溶液中，使蛋白质浓度约为 2 mg/mL（依据 GB 5009.5—2025 测定样品蛋白质含量后计算）。

6.3 驼乳粉样品前处理

6.3.1 称取驼乳粉样品 0.5 g（精确至 0.001 g）于 50 mL 离心管中，加入 10 mL 预冷至 40 ℃的去离子水，涡旋混匀使样品充分溶解。
6.3.2 于 4 ℃条件下以 10000 r/min 离心 15 min，弃去上层脂肪层。
6.3.3 按 6.2.3～6.2.5 步骤操作。

6.4 空白对照、参比样品同步处理

6.4.1 每批次试验应设置空白对照和参比样品，与待测样品同步进行前处理和酶解。
6.4.2 空白对照采用 100 mmol/L 碳酸氢铵溶液代替样品，其余步骤与样品处理一致。
6.4.3 参比样品包括纯驼乳参比样品和异种乳源参比样品（牛乳、羊乳），按 6.2 或 6.3 步骤进行同步处理。

7 试验方法

7.1 蛋白还原与烷基化

取蛋白质溶液（6.2.5或6.3.3）200 μL于1.5 mL微量离心管中，加入100 mmol/L DTT溶液20 μL，于56 ℃恒温振荡器中反应30 min。冷却至室温后，加入200 mmol/L IAA溶液20 μL，于室温避光反应30 min。

7.2 蛋白酶解

向还原烷基化后的蛋白溶液中加入1 mg/mL胰蛋白酶溶液，按酶与蛋白质量比1:50（m/m）加入，于37 ℃恒温振荡器中酶解12 h～16 h。

7.3 酶解液净化

7.3.1 采用 C_{18}固相萃取小柱进行净化。
7.3.2 依次用 1 mL～3 mL 乙腈（80%）、1 mL～3 mL 甲酸水溶液（0.1%）活化小柱。
7.3.3 将酶解液上样，控制流速约为 1 mL/min～2 mL/min。
7.3.4 用 1 mL～3 mL 甲酸水溶液（0.1%）淋洗，弃去流出液。
7.3.5 用 0.5 mL～1 mL 50%乙腈水溶液（含 0.1%甲酸）洗脱肽段，收集洗脱液。
7.3.6 将洗脱液氮吹至干，用 100 μL 甲酸水溶液（0.1%）复溶，涡旋混匀后以 12000 r/min 离心 10 min，取上清液供液相色谱-高分辨质谱分析。

7.4 色谱条件

7.4.1 色谱柱：C_{18}色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）或等效色谱柱。
7.4.2 柱温：40 ℃。
7.4.3 流动相：A 相为 0.1%甲酸水溶液（体积分数），B 相为乙腈（含 0.1%甲酸）。
7.4.4 流速：0.3 mL/min。
7.4.5 进样量：2 μL～5 μL（根据肽段浓度调整，宜使总离子流图中最强峰强度在仪器线性响应范围内）。

7.4.6 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	A相/%	B相/%
0	95	5
5	95	5
40	65	35
45	5	95
50	5	95
50.1	95	5
55	95	5

注：梯度洗脱程序可根据色谱柱性能和肽段分离情况适当调整，但应保证驼乳特征肽段和异种乳源特征肽段的有效分离和良好峰形。每次调整后应重新用参比样品进行保留时间校准。

7.5 质谱条件

7.5.1 离子源：加热电喷雾离子源（HESI），正离子模式。
7.5.2 喷雾电压：3.0 kV～3.5 kV。
7.5.3 毛细管温度：320 ℃。
7.5.4 鞘气流量：35 arb。
7.5.5 辅助气流量：10 arb。
7.5.6 数据采集模式：数据依赖型二级质谱（DDA）扫描模式。
7.5.7 一级质谱分辨率：70000（FWHM，m/z 200）。
7.5.8 二级质谱分辨率：17500（FWHM，m/z 200）。
7.5.9 一级质谱扫描范围：m/z 300～2 000。
7.5.10 碰撞能量：归一化碰撞能量（NCE）为 27%～32%。
7.5.11 动态排除时间：15 s～30 s。

7.6 数据处理与肽段匹配

7.6.1 使用蛋白质组学数据处理软件对原始质谱数据进行数据库检索。
7.6.2 检索数据库应包含骆驼（Camelus）、家牛（Bos taurus）、山羊（Capra hircus）、绵羊（Ovis aries）等物种的乳蛋白氨基酸序列信息，推荐使用 UniProt 数据库。
7.6.3 母离子质量偏差应小于 10 ppm，碎片离子质量偏差应小于 0.5 Da。
7.6.4 肽段鉴定假阳性率（FDR）应低于 1%。
7.6.5 将待测样品中鉴定到的肽段与附录 A 所列驼乳特征肽段及常见掺假乳源特征肽段进行匹配。

8 结果判定

8.1 骆驼源性成分的判定

8.1.1 待测样品中检出附录 A 表 A.1 所列驼乳特征肽段≥2 条时，判定样品含有驼乳源性成分。
8.1.2 当待测样品中仅检出 1 条驼乳特征肽段时，应进行重复试验确认；若重复试验仍仅检出 1 条驼乳特征肽段，应结合其他方法（如 DNA 检测、电泳、ELISA 等）进行综合判定。
8.1.3 当待测样品中未检出任何驼乳特征肽段时，判定样品中不含驼乳源性成分（或驼乳源性成分含量低于方法检出限）。
8.1.4 空白对照中不应检出任何驼乳特征肽段；若空白对照中检出驼乳特征肽段，说明试验过程存在污染，该批样品结果无效，应排查污染源后重新试验。

8.2 非骆驼源性成分的判定

8.2.1 待测样品中检出附录 A 表 A.2、A.3 所列任一异种乳源（牛乳、羊乳）特征肽段≥1 条时，判定样品含有该异种乳源成分。
8.2.2 当需要判定其他非驼乳源性成分（如水牛乳、牦牛乳、马乳、驴乳等）时，应建立相应物种的

特征肽段库，并按照本方法的原理和流程进行检测和判定。

8.2.3 空白对照中不应检出任何非驼乳源性特征肽段；若空白对照中检出，说明试验过程存在污染，该批样品结果无效。

8.3 真实性结论

8.3.1 待测样品同时满足以下条件时，判定为纯驼乳（粉）产品：

a) 检出驼乳特征肽段≥2 条；
b) 未检出附录 A 表 A.2 所列任何异种乳源特征肽段。

8.3.2 待测样品检出驼乳特征肽段≥2 条，且检出附录 A 表 A.2、A.3 所列任一异种乳源特征肽段时，判定样品存在掺假，掺假乳源为检出的异种乳源特征肽段所对应的物种。

8.3.3 待测样品未检出驼乳特征肽段时，判定样品不含骆驼源性成分。

8.4 试验报告

试验报告至少应包含以下信息：

a) 样品名称、规格、批号、生产日期、生产单位、样品状态；
b) 采样日期、采样地点、采样人、样品保存条件；
c) 检测依据（本标准编号和名称）；
d) 检测日期、检测地点、检测人员；
e) 仪器设备名称、型号、编号；
f) 色谱柱信息（品牌、型号、规格、柱温、流动相、梯度程序、流速、进样量）；
g) 质谱条件（电离方式、扫描范围、分辨率、碰撞能量等关键参数）；
h) 使用的特征肽段数据库及版本；
i) 空白对照和参比样品的检测结果；
j) 样品中检出的特征肽段信息（物种来源、肽段序列、保留时间、母离子质荷比、电荷态、匹配的碎片离子数、峰面积）；
k) 真实性判定结论；
l) 检测过程中出现的异常情况及说明；
m) 检测人员、审核人员、批准人员签名及日期；
n) 检测机构名称、地址、联系方式、资质认定标志（如适用）。

9 方法学性能要求

9.1 特异性

本方法应能区分驼乳与牛乳、山羊乳、绵羊乳的特征肽段。各物种特征肽段之间不应存在交叉干扰。

9.2 检出限

本方法对牛乳、羊乳的掺假检出限（LOD）应不高于5%（质量分数）。

9.3 重复性

在同一实验室，由同一操作者使用相同设备，采用相同方法在短时间内对同一样品进行两次独立测定，两次测定结果的相对偏差应不大于5%。

9.4 确认要求

当检出异种乳源特征肽段时，宜采用合成特征肽段标准品进行确认。确认时应满足以下条件：

a) 合成肽段的保留时间与样品中检出肽段的保留时间偏差应不大于±0.2 min；
b) 合成肽段的二级质谱碎片离子应与样品中检出肽段的碎片离子匹配，匹配碎片离子数不少于 2 个。

附 录 A
（规范性）
驼乳特征肽段及常见掺假乳源特征肽段参考表

A.1 驼乳特征肽段

驼乳特征肽段参考表如表A.1所示。

表 A.1 驼乳特征肽段参考表

序号	肽段序列	来源蛋白	UniProt ID
C1	INEDNHPQLGEPVK	α-S1-酪蛋白	O97943
C2	LLQLEAIR	α-S1-酪蛋白	O97943
C3	GLHPVPQPLVPVIA	β-酪蛋白	A0A452DHW7
C4	YFPIQFVQSR	κ-酪蛋白	O97851
C5	NICDISCDK	α-乳白蛋白	P01164
C6	LEQWQCEK	α-乳白蛋白	P01164

注：使用者可根据实际情况补充其他经验证的驼乳特征肽段，但特征肽段应满足以下条件：a）在目标物种乳中稳定存在，在其他物种乳中不存在；b）胰蛋白酶酶解后产生，质谱响应良好；c）加工过程（巴氏杀菌、灭菌、喷雾干燥等）中保持稳定。

A.2 牛乳特征肽段

牛乳特征肽段参考表如表A.2所示。

表 A.2 牛乳特征肽段参考表

序号	肽段序列	来源蛋白	UniProt ID
M1	NMAINPSK	α-S2酪蛋白	P02663
M2	FALPQYLK	α-S2酪蛋白	P02663
M3	IHPFAQTQ	β-酪蛋白	P02666
M4	AVPYPQR	β-酪蛋白	P02666
M5	VLVLDTDYK	β-乳球蛋白	P02754
M6	IDALNENK	β-乳球蛋白	P02754

A.3 羊乳特征肽段

羊乳特征肽段参考表如表A.3所示。

表 A.3 羊乳特征肽段参考表

序号	肽段序列	来源蛋白	UniProt ID
G1	VLPVPQKAVPYPQRDMPIQAFLLYQEPVLGPVRGPFPIIV	β-酪蛋白	P11804
G2	DMPIQAFLLYQEPVLGPVRGPFPIIV	β-酪蛋白	P11804
G3	YVEPFPEVFGK	β-乳球蛋白	P02755
G4	TPEVDDEALEKFDK	β-乳球蛋白	P02755

参考文献

[1] Karamoutsios, A.; Lekka, P.; Voidarou, C.C.; Dasenaki, M.; Thomaidis, N.S.; Skoufos, I.; Tzora, A. Assessing Milk Authenticity Using Protein and Peptide Biomarkers: A Decade of Progress in Species Differentiation and Fraud Detection. Foods 2025, 14, 2588. https://doi.org/10.3390/foods14152588

[2] 一种骆驼奶特征肽段组合及鉴定方法: CN114276431B[P]. 2023-10-20.

[3] 一种用于检测骆驼奶中掺入牛奶的特征肽组合及方法: CN111766323A[P]. 2020-10-13.

[4] GB 19644—2024 食品安全国家标准 乳粉和调制乳粉

[5] GB/T 27404—2026 实验室质量控制规范 食品理化检测

[6] NY/T 4630—2025 牛乳及其制品中α-乳白蛋白和β-乳球蛋白的测定 高效液相色谱法