

液质联用多肽识别技术鉴别鳖甲胶的研究

刘宇文, 杨直, 谌宇, 卢智玲(杭州市食品药品检验研究院, 杭州 310022)

摘要: 目的 找出鳖甲胶与龟甲胶、鹿角胶、阿胶、黄明胶、新阿胶、佛罗里达鳖甲胶、山瑞鳖甲胶的差异性特征肽段, 从而建立专属性的鉴别方法。方法 用水提取样品, 胰蛋白酶进行酶解, 采用超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱和数据处理软件对酶解样品进行分析处理, 查找鳖甲胶特征肽; 采用超高效液相色谱-串联四级杆质谱的多反应检测建立专属性鉴别方法。结果 找出鳖甲胶的特征离子为 m/z 784.90(双电荷), 鉴定序列为 GETGPVGVTVSGVPAGAR, 为鳖的I型 $\alpha 2$ 链胶原蛋白中的一部分。利用特征肽段二级质谱图, 确定了专属性检测离子对 m/z 784.90(双电荷) \rightarrow 872.45, 1 028.55, 建立了鳖甲胶专属性鉴别方法。结论 确定的鳖甲胶特征肽专属性强, 该方法的专属性、精密度和灵敏度符合分析检测的技术要求。

关键词: 鳖甲胶; 特征离子; 超高效液相色谱-串联质谱法; 多肽

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)24-3061-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.24.011

引用本文: 刘宇文, 杨直, 谌宇, 等. 液质联用多肽识别技术鉴别鳖甲胶的研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(24): 3061-3063.

Identification Study of Trionycis-Shell Glue by UPLC-MS/MS Marker Peptide

LIU Yuwen, YANG Zhi, CHEN Yu, LU Zhiling(Hangzhou Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310022, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a specific method for identification of trionycis-shell glue by finding the marker peptide different from glue of tortoise shell, deerhorn glue, donkey-hide gelatin, bovine-hide gelatin, pig-hide gelatin, *Apalone ferox* glue and *Palea steindachneri* glue. **METHODS** Samples were extracted with water, trypsin was used for enzymolysis. UPLC-Q-TOF/MS and data processing software were used to analyze the enzymolyzed samples to find the marker peptides of trionycis-Shell glue. Specific method was established by Multi-reaction detection of UPLC-Q-TOF/MS. **RESULTS** The marker peptide of trionycis-shell glue [m/z 784.90($n=2$)] was found. This polypeptide sequence was GETGPVGVTVSGVPAGAR, one of fragmentation of collagen α -2(I) chain [*Trionyx sinensis*]. Used this characteristic ions, m/z 784.90($n=2$) \rightarrow 872.45, 1 028.55, established an analysis method for identification of trionycis-shell glue. **CONCLUSION** The established present method was specific, precise and reliable. The research provided a possible approach for trionycis-shell glue. **KEYWORDS:** trionycis-shell glue; characteristic ion; UPLC-MS/MS; peptide

鳖甲胶为鳖 *Trionyx sinensis* Wiegman 的背甲经煎煮、浓缩制成固体胶, 具有滋阴补血, 退热消瘀的功效, 用于阴虚潮热、虚劳咳血、久疟、疟母、痔核肿痛、血虚经闭等症, 收载于部颁药品标准中药材第一册, 质量标准尚不完善^[1]。胶原蛋白特征肽鉴别方法已成功用于阿胶、龟甲胶及鹿角胶等胶类的真伪鉴别, 很好地控制了这几种胶类的质量。同为胶类制剂的鳖甲胶, 未见有该技术用于鳖甲胶的质量控制的报道, 不利于监管和临床用药, 极易出现用廉价胶类掺入鳖甲胶中的情况^[2-4]。为探索鳖甲胶的质量控制方法, 本研究借鉴药典胶类药材的特征肽鉴别技术, 首次将该技术用于鳖甲胶的鉴别。

1 仪器与试剂

6540 超高效液相色谱-串联四级杆飞行时间质谱联用仪(美国 Agilent); 8050 超高效液相色谱-串联三重四级杆质谱联用仪(日本岛津); TW-8 电热恒温水浴锅(德国 JULABO); XS105 电子天平(瑞士 METTLER)。

胰蛋白酶为质谱级(批号: SLBG6452V; Sigma 公司); 甲酸、乙腈均为色谱纯; 碳酸氢铵分析纯; 纯净水为 Milli-Q 纯水; 龟甲胶对照药材(批号: 121693-201301)、阿胶对照药材(批号: 121274-201703)、黄明胶对照药材(批号: 121695-201301)、鹿角胶对照药材(批号: 121694-201301)、新阿胶(批号: 121694-201701)均购自中国食品药品检定研究

基金项目: 浙江省食品药品监督管理局科技计划项目(2019009)

作者简介: 刘宇文, 男, 硕士, 副主任中药师 Tel: (0571)85460802 E-mail: liuyuwen01@126.com

院：鳖(*Trionyx sinensis* Wiegman)甲胶、山瑞鳖(*Palea steindachneri*)甲胶、佛罗里达鳖(*Apalone ferox*)甲胶各 5 份为实验室自制，所用原料均由刘宇文副主任中药师鉴定。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备^[5-6]

取样品 0.1 g，置 100 mL 量瓶中，加 1%碳酸氢铵溶液适量，超声处理 30 min，加碳酸氢铵溶液稀释至刻度，摇匀，用 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液 100 μL，置微量进样瓶中，加胰蛋白酶溶液(加 1%碳酸氢铵溶液制成每 1 mL 中含 1 mg 的溶液，临用前现配)10 μL，摇匀，37 °C 恒温酶解 12 h，即得。

2.2 特征肽查找与鉴定

2.2.1 仪器条件 色谱条件：ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)；柱温 35 °C；流动相为 0.1%甲酸(A)-乙腈(B)；梯度洗脱(0~25 min, 95%→80%A; 25~50 min, 80%→5%A)；流速为 0.3 mL·min⁻¹；post time: 3 min。

质谱条件：ESI⁺离子源；扫描范围 m/z 100~3 200；二级质谱扫描模式为 Target MS/MS；提取离子窗范围为 0.5 ppm。离子源参数：雾化气(N₂)35 psi；干燥气(N₂)流速为 8 L·min⁻¹；干燥气温度 300 °C；鞘气流速 12 L·min⁻¹；鞘气温度 350 °C；毛细管电压 4 kV；碎裂电压 120 V；参比离子(m/z)为 121.050 6 和 922.009 8。

2.2.2 特征肽查找 分别取龟甲胶、阿胶、黄明胶、鹿角胶、新阿胶、山瑞鳖甲胶、佛罗里达鳖甲胶、鳖甲胶 0.1 g，按“2.1”项下方法分别制备 10 份供试品溶液，分别精密吸取 5 μL 注入超高效液相色谱-串联四级杆飞行时间质谱联用仪，获得相应的总离子流图。采用 Agilent MassProfiler Professional(MPP) 分析软件(Version.B.14.00, Agilent Technologies)对各总离子流图进行统计分析，找到鳖甲胶特征肽酶解肽段 m/z 784.90(双电荷)。

2.2.3 特征肽鉴定 将鳖甲胶特征肽 m/z 784.90(双电荷)的二级质谱数据导出，生成 mgf 格式文件，并采用 MASCOT 网络检索(<http://www.matrixscience.com>)，在 SWISS-PROT 和 NCBI nr 数据库中进行检索，结果显示 m/z 784.90(双电荷)为鳖甲的 I 型 α₂ 链胶原蛋白的酶解肽段匹配度最高(得分 102)，结合二级质谱图分析，并经过合成

多肽验证，确认序列为 GETGPVGVGTGSVGPAGAR，碎片离子匹配见图 1。

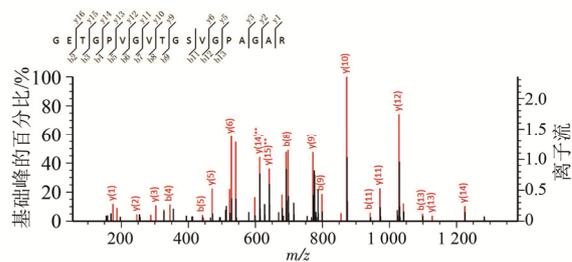


图 1 鳖甲特征肽 m/z 784.90 碎片离子匹配图

Fig. 1 Trionyx-shell glue characteristic ion m/z 784.90 MS/MS spectrum match figure

2.3 鉴别方法建立与方法学考察

2.3.1 仪器条件 色谱条件同“2.2.1”项下。

质谱条件：ESI⁺离子源；采集模式 MRM；离子源电压 4 kV；雾化器流速 3 L·min⁻¹；加热气流速：8 L·min⁻¹；接口温度 300 °C；DL 温度 150 °C；加热模块温度 250 °C；干燥器流速：10 L·min⁻¹。以鳖甲胶特征肽段 m/z 784.90(双电荷)为母离子，选择其离子强度最大的 872.45, 1 028.55 的碎片为鳖甲胶专属性检测离子对 m/z 784.90(双电荷)→872.45, 1 028.55，色谱图见图 2。

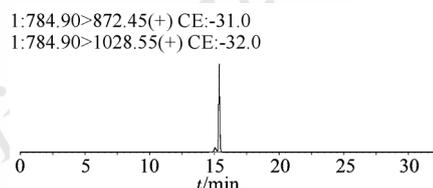


图 2 鳖甲胶特征离子色谱图

Fig. 2 Trionyx-shell glue characteristic ion chromatogram

2.3.2 专属性试验 以龟甲胶、阿胶、黄明胶、鹿角胶、新阿胶、山瑞鳖甲胶、佛罗里达鳖甲胶为阴性样品，以鳖甲胶为阳性样品，选择鳖甲胶特征离子对 m/z 784.90(双电荷)→872.45, 1 028.55 进行检测，结果龟甲胶、阿胶、黄明胶、鹿角胶、新阿胶、山瑞鳖甲胶、佛罗里达鳖甲胶的色谱图中，在与鳖甲胶色谱图相应位置上无相应的色谱峰，认为龟甲胶、阿胶、黄明胶、鹿角胶、新阿胶、山瑞鳖甲胶、佛罗里达鳖甲胶对测定无干扰。

2.3.3 检测限 取鳖甲胶 0.100 3 g，置 100 mL 量瓶中，加 1%碳酸氢铵溶液适量，超声处理 30 min，加碳酸氢铵溶液稀释至刻度，摇匀，再精密量取适量，用 1%碳酸氢铵溶液分别精密稀释 20, 50, 100 倍，制得含 0.01, 0.02, 0.05 mg·mL⁻¹ 的鳖甲

胶系列样品溶液,自“用 0.22 μm 微孔滤膜滤过”开始,按“2.1”项下方法酶解,以鳖甲胶特征分子离子峰 m/z 784.90(双电荷) \rightarrow 872.45, 1 028.55 作为检测离子对进行检测,含 0.02 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 鳖甲胶的样品溶液中,特征分子离子峰的信噪比为 3:1 左右,故检测限规定为 0.02 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$:在 MRM 模式下,最低检出浓度为含 0.02 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 鳖甲胶样品。

2.3.4 重复性试验 取鳖甲胶平行按“2.1”项下方法制备 6 份供试品溶液,以鳖甲胶特征离子对 m/z 784.90(双电荷) \rightarrow 872.45, 1 028.55 为检测离子对进行检测,结果 6 份鳖甲胶供试品溶液均检出相应的鳖甲胶特征分子离子峰,重复性良好。

2.3.5 特征肽代表性试验 取实验室自制的 5 份鳖甲胶样品,用所建立的方法分别进行检测,结果均检出鳖甲胶特征离子对,以合成特征肽初步计算含量,鳖甲胶特征肽在 0.41~0.74 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,所选特征肽具有代表性。

2.4 样品测定结果

用所建立的方法对市场上鳖甲胶进行检测,20 批样品中,仅 12 批检出鳖甲胶特征成分,参考法定标准^[3]对 8 批未检出鳖甲胶特征成分的样品进行检测,均为黄明胶冒充,结果表明鳖甲胶确有掺伪的情况,急需提高鳖甲胶的质量标准。

3 讨论

鳖甲胶特征肽鉴别的关键在于找到其中的特征肽成分,而胶类药材的酶解多肽混合溶液中成分非常复杂,单凭直观的比对无法找到鳖甲胶与其他胶类的差异性特征肽段^[7-8]。因此,本研究利用安捷伦 MPP 代谢组学统计软件对各类胶类酶解肽图进行统计学处理,找到了鳖甲胶区别于其他胶类的特征肽段。利用特征肽段,建立了鳖甲胶的特征肽检测方法,该方法高效、快速、专属,可以用于鳖甲胶的质量控制。

MASCOT 是目前应用最广的蛋白质或多肽鉴定数据库检索软件,是目前基于质谱数据进行蛋白质或多肽鉴定、翻译后修饰、定量蛋白质组学等研究不可或缺的重要软件。SWISS-PROT 是具有高准确性的蛋白质序列数据库,由欧洲生物信

息学研究所(EBI)维护;NCBI 即美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information),由美国国立卫生研究院(NIH)创办,是目前广泛应用的生物学数据库^[9-10]。网络检索成功的前提是该蛋白质收载于数据库中,如果尚未收载,就无法从数据库中下载完整的序列。

目前,鳖甲胶主要问题在于廉价杂皮胶掺假的问题,考虑到佛罗里达鳖、山瑞鳖等非药用鳖甲类动物养殖已经获得成功,有可能混充正品鳖甲熬胶,故一并考虑研究。本研究所找到的鳖甲胶酶解特征肽,还可用于鳖甲药材、含有鳖甲或鳖甲胶的中成药的鉴别和质量控制,但必须相应调整取样量及提取方法,同时可为进一步提高药典鳖甲质量标准提供参考。

REFERENCES

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. WS3-B-3719-98 卫生部颁药品标准(中药材第一册)[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 1998: 103
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2015: 189-190.
- [3] 国家食品药品监督管理局. 药品检验补充检验方法和检验项目批准件 2012001[S]. 2012-4-23.
- [4] LI M H, LONG G Y, CHENG X L. LC-MS/MS analysis of gelatine ingredients in chinese patent medicines [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2015, 50(24): 2151-2153.
- [5] WEI F, CHENG X L, SHI Y, et al Method development and application of UPLC-QTOF-MS for identification of five gelatin drugs China Pharmaceutical Congress. 2011 China Pharmaceutical Congress and 11th China Pharmacist Weekly Papers Collection [C]. Yantai, Shandong Province: China Conference, 2011.
- [6] CHEN J, CHENG X L, WEI F, et al. Qualitative RRLC-QQQ/MS analysis of donkey-hide gelatin in Fufang Ejiao Jiang [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析), 2015, 32(2): 328-332.
- [7] CHENG X L. Study on key technologies of quality control of glues medicines [D]. Beijing: Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2014.
- [8] LIU S S. Method development for quantitative mass spectrometry analysis in proteomic studies [D]. Tianjin: Nankai University, 2014.
- [9] 廖志华, 谌容, 陈敏, 等. 生物学信息库简介[J]. 生物学教学, 2006, 31(1): 61-62.
- [10] 刘树春. 利用 SWISS-PROT 网获取生物信息学资源[J]. 生命的化学, 2002, 22(1): 81-82.

收稿日期: 2018-12-20

(本文责编: 蔡珊珊)