

# 特征肽技术用于龟甲(浙龟甲)中掺巴西龟的检查研究

刘宇文, 邹耀华, 侯娜(杭州市食品药品检验研究院, 杭州 310022)

**摘要:** 目的 找出巴西龟特征肽段, 建立龟甲(浙龟甲)中掺入巴西龟的专属性检查方法。方法 样品以水提法提取, 胰蛋白酶酶解, 利用超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱和数据处理软件查找巴西龟特征肽, 并利用蛋白质搜库技术初步测序; 利用找到的特征肽段, 建立超高效液相色谱-串联四级杆质谱的多反应监测的巴西龟掺伪专属性检查方法。结果 找出巴西龟特征性肽段  $m/z$  400.23(双电荷), 并初步测定序列, 通过分析该特征肽段二级质谱图, 确定了专属性检测离子对  $m/z$  400.23(双电荷)  $\rightarrow$  374.05, 142.90, 并建立了龟甲(浙龟甲)中掺入巴西龟的专属性检查方法。20 批样品中, 11 批样品检出巴西龟成分。结论 该方法的专属性强, 符合分析检测的方法技术要求, 可用于龟甲(浙龟甲)掺入巴西龟的检查。

**关键词:** 乌龟; 黄缘闭壳龟; 黄喉拟水龟; 巴西龟; 掺伪; 特征肽; 高效液相色谱-串联质谱法

中图分类号: R282.74

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2019)22-2810-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.22.012

引用本文: 刘宇文, 邹耀华, 侯娜. 特征肽技术用于龟甲(浙龟甲)中掺巴西龟的检查研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(22): 2810-2813.

## Detection of Brazilian Tortoise in Tortoise Shell(Zhejia Tortoise Shell) by Characteristic Peptide Technique

LIU Yuwen, ZOU Yaohua, HOU Na(Hangzhou Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310022, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To find out the characteristic peptide of *Trachemys scripta elegans* (Wied.) and establish a specific method for adulteration of tortoise-shell(Zhejiang tortoise shell). **METHODS** The samples were extracted by water extraction method, hydrolyzed by trypsin, searched for the characteristic peptide of *Trachemys scripta elegans* (Wied.) by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) and data processing software, and sequenced by protein library searching technology. Ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry(UPLC-QQQ-MS) was used to establish the specific method based on the marker peptide of *Trachemys scripta elegans* (Wied.). **RESULTS** The marker peptides[ $m/z$  400.23( $n=2$ )] of *Trachemys scripta elegans* (Wied.) was found. Using this characteristic ions,  $m/z$  400.23( $n=2$ )  $\rightarrow$  374.05, 142.90, established an analysis method for identification of *Trachemys scripta elegans* (Wied.). In 20 samples, 11 samples detected *Trachemys scripta elegans* (Wied.) characteristic peptide. **CONCLUSION** This method has strong specificity and meets the technical requirements of analysis. This method can be used for the inspection of tortoise shell (Zhejiang tortoise shell) mixed with *Trachemys scripta elegans* (Wied.).

**KEYWORDS:** *Chinemys reevesii* (Gray); *Cyclemys flavomarginata* Gray; *Clemmys mutica* (Cantor); *Trachemys scripta elegans* (Wied.); adulteration; characteristic peptide; UPLC-MS/MS

龟甲为乌龟 *Chinemys reevesii* (Gray)的背甲及腹甲, 具有滋阴潜阳、益肾强骨、养血补心的作用, 用于阴虚潮热、骨蒸盗汗等症<sup>[1]</sup>。浙龟甲为黄喉拟水龟 *Clemmys mutica* (Cantor)、黄缘闭壳龟 *Cyclemys flavomarginata* Gray 的背甲及腹甲, 收载于浙江省中药炮制规范 2015 版, 在浙江省可与龟甲同等药用。相对于廉价混伪品, 正品龟甲(浙龟甲)价格较高, 其中以巴西龟(红耳泥龟)*Trachemys scripta elegans* (Wied.)腹甲及背甲混充龟甲的情况最为严重<sup>[2-3]</sup>。龟甲类药材性状的鉴别已报道较多, 而加工成饮片时, 需除净皮肉, 原本的性状特征

已不存在, 难以通过传统的鉴别方法进行鉴别, 特别是掺入部分伪品的情況更无从鉴别。PCR 技术已成功用于龟甲药材鉴别, 但目前还有许多不足, 如无法确定掺伪量。特征肽技术已成功应用于胶类药材的鉴别和掺伪检测<sup>[4-9]</sup>, 本实验借鉴胶类药材的特征肽鉴别技术, 首次将该技术用于龟甲(浙龟甲)的掺伪检查中。

### 1 仪器与试剂

#### 1.1 仪器

6540 高效液相色谱-串联四级杆飞行时间质谱联用仪(美国 Agilent); TW-8 电热恒温水浴锅(德

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)85463891

E-mail: liuyuwen01@126.com

国 JULABO); XS105 电子天平(瑞士 METTLER)。

## 1.2 试剂

胰蛋白酶为质谱级(Sigma 公司, 批号: SLBG6452V); 甲酸、乙腈均为色谱纯; 碳酸氢铵为分析纯; 纯净水为 Milli-Q 纯水; 乌龟、黄喉拟水龟、黄缘闭壳龟、巴西龟, 所用原料均由诸葛陇副主任中药师鉴定, 测试样品来源于 2017 年浙江省级药品质量评价, 保存于杭州市食品药品检验研究院标本室; 龟甲对照药材(中国食品药品检定研究院, 批号: 121494-201403)。

## 2 方法与结果

### 2.1 供试品溶液的制备<sup>[1]</sup>

取供试品适量, 粉碎, 过 4 号筛, 取约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加水 50 mL, 浸泡 1 h, 称定质量, 电热套中加热回流提取 1 h, 放冷, 用水补足减失的质量, 再加入碳酸氢铵 0.5 g 并使溶解, 静置, 取上清液用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 取 100  $\mu\text{L}$  续滤液, 至微量进样瓶中, 加胰蛋白酶溶液(取胰蛋白酶, 加 1%碳酸氢铵溶液溶解, 制成每 1 mL 中含 1 mg 的溶液, 临用前现配制) 10  $\mu\text{L}$ , 混匀, 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温酶解 12 h, 即得。

### 2.2 巴西龟特征肽查找

#### 2.2.1 仪器条件

**2.2.1.1 色谱条件** 色谱柱: ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub>(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ); 柱温: 35  $^{\circ}\text{C}$ ; 流动相: 0.1% 甲酸(A)-乙腈(B); 梯度洗脱: 0~25 min, 95% $\rightarrow$ 80%(A), 25~50 min, 80% $\rightarrow$ 5%(A); 进样量: 5  $\mu\text{L}$ ; 流速: 0.3 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ 。

**2.2.1.2 质谱条件** ESI<sup>+</sup>离子源; 扫描范围  $m/z$  100~3 200; 二级质谱扫描模式: Target MS/MS; 提取离子窗范围: 0.5 ppm。离子源参数: 雾化气(N<sub>2</sub>): 35 psi; 干燥气(N<sub>2</sub>): 流速为 8 L $\cdot\text{min}^{-1}$ ; 干燥气温度: 300  $^{\circ}\text{C}$ ; 鞘气流速: 12 L $\cdot\text{min}^{-1}$ ; 鞘气温度: 350  $^{\circ}\text{C}$ ; 毛细管电压: 4 kV; 碎裂电压: 120 V; 参比离子( $m/z$ ): 121.050 6 和 922.009 8。

**2.2.2 特征肽查找<sup>[6,8-9]</sup>** 分别取乌龟、黄喉拟水龟、黄缘闭壳龟、巴西龟样品, 按“2.1”项下方法分别制备供试品溶液, 精密吸取 5  $\mu\text{L}$  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, 见图 1。采用安捷伦 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, 找到巴西龟甲特征酶解肽段  $m/z$  400.25(双电荷)。

**2.2.3 特征肽序列初步鉴定** 将巴西龟甲特征离子  $m/z$  400.25(双电荷)的二级质谱数据导出, 生成 mgf 格式文件, 并采用 MASCOT 网络检索工具 (<http://www.matrixscience.com>), 在 SWISS-PROT 和 NCBIInr 数据库中进行检索, 结合二级质谱图分析, 结果得到  $m/z$  400.25(双电荷)其序列分值最高为: LGVVGLGGK, 碎片离子匹配见图 1。

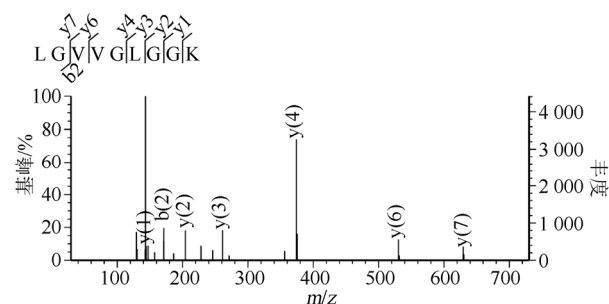


图 1 碎片离子匹配图

Fig. 1 Matching diagram of fragment ions

### 2.3 巴西龟掺伪检查方法建立

#### 2.3.1 仪器条件

**2.3.1.1 色谱条件** 色谱柱: ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub>(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ); 柱温: 35  $^{\circ}\text{C}$ ; 流动相: 0.1% 甲酸(A)-乙腈(B); 梯度洗脱: 0~25 min, 95% $\rightarrow$ 80%(A), 25~35 min, 80% $\rightarrow$ 5%(A); 进样量: 1  $\mu\text{L}$ ; 流速: 0.3 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ 。

**2.3.1.2 质谱条件** ESI<sup>+</sup>离子源; 采集模式: MRM; 离子源电压: 4 kV; 雾化器流速: 3 L $\cdot\text{min}^{-1}$ ; 加热气流速: 8 L $\cdot\text{min}^{-1}$ ; 接口温度: 300  $^{\circ}\text{C}$ ; DL 温度: 150  $^{\circ}\text{C}$ ; 加热模块温度: 250  $^{\circ}\text{C}$ ; 干燥器流速: 10 L $\cdot\text{min}^{-1}$ ; CE: -20 V。

**2.3.2 离子对选择** 根据  $m/z$  400.25(双电荷)二级质谱扫描数据, 以  $m/z$  400.23 $\rightarrow$ 374.05 离子对为半定量离子对,  $m/z$  400.23 $\rightarrow$ 142.90 作为定性离子对, 色谱图见图 2。

1 : 400.25 $\rightarrow$ 374.05(+) CE: -20.0

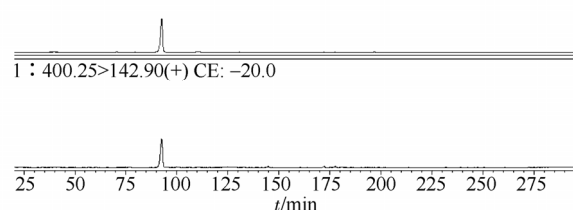


图 2 巴西龟甲  $m/z$  400.2 特征离子色谱图

Fig. 2 Characteristic ion chromatogram of Brazilian tortoise shell  $m/z$  400.2

**2.3.3 专属性试验** 以龟甲对照药材、黄喉拟水龟、黄缘闭壳龟作为阴性样品,以巴西龟甲为阳性样品,选择巴西龟甲特征分子离子峰  $m/z$  400.25→374.05, 142.90 作为检测离子对进行测定,结果阴性样品的色谱图中,在与巴西龟样品相应的位置上均无相应的色谱峰,认为巴西龟特征肽专属性强。

**2.3.4 检测限** 取巴西龟甲药材粉末(4号筛)1.001 5 g,按“2.1”项下方法处理,再精密量取制备好的巴西龟甲溶液 0.03, 0.05, 0.3, 0.5 mL,置 10 mL 量瓶中,用龟甲对照基质溶液(1 g→50 mL)稀释,分别制成以 0.060 09, 0.100 15, 0.600 9, 1.001 5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  系列巴西龟甲参比溶液、以  $m/z$  400.25→374.05 作为定量离子对进行检测,结果巴西龟甲参比溶液质量浓度为 0.100 15  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  时,其特征分子离子峰  $m/z$  400.25→374.05 的信噪比为 10:1。故检测限规定为,在 MRM 模式下,巴西龟甲参比溶液的最低检出质量浓度为 0.1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**2.3.5 线性关系** 取巴西龟甲药材粉末(4号筛)1.001 5 g,置具塞锥形瓶中,精密加水 50 mL,浸泡 1 h,称定质量,电热套中加入回流提取 1 h,放冷,用水补足减失的重量,再加入碳酸氢铵 0.5 g 并使溶解,静置,过滤。分别吸取上述滤液 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 2, 10 mL 置 10 mL 量瓶中,加入制备好的龟甲基质溶液(1 g→50 mL)至刻度,摇匀。取上清液用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,取 100  $\mu\text{L}$  续滤液,至微量进样瓶中,加胰蛋白酶溶液(取胰蛋白酶,加 1%碳酸氢铵溶液溶解,制成每 1 mL 中含 1 mg 的溶液,临用前现配制) 10  $\mu\text{L}$ ,混匀,37  $^{\circ}\text{C}$  恒温酶解 12 h,即得。按“2.3.1.1”项下色谱条件,注入液相色谱仪,测得峰面积。以峰面积值为纵坐标,巴西龟甲参比浓度为横坐标,绘制标准曲线,计算回归方程:  $y=96\,317x+32\,354$ ,  $r=0.998\,6$ ,在 0.100 15~20.030  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  内,巴西龟甲参比溶液的浓度与色谱峰面积成正比例关系,符合半定量要求。

**2.3.6 重复性试验** 按“2.1”项下方法平行制备 6 份含 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  巴西龟甲的供试品溶液,以巴西龟甲特征分子离子峰  $m/z$  400.25→374.05, 142.90 作为检测离子对。结果 6 份龟甲供试品溶液中均检出相应的巴西龟甲特征分子离子峰,且  $m/z$  400.25→374.05 定量离子对峰面积 RSD<2.0%。

## 2.4 结果判断

参照中国药典 2015 年版四部“0212 药材和饮片检定通则”中规定<sup>[1]</sup>,药屑杂质通常不得>3%的要求,考虑到质谱仪器的检测误差等原因,为避免假阳性,故放宽限度至 5%。建议巴西龟甲成分检查项规定:供试品的  $m/z$  400.25→374.05, 142.90 提取离子流图色谱中,应不得同时出现与对照品色谱保留时间相同的色谱峰,若同时出现,则要求样品中  $m/z$  400.25→374.05 提取离子流图中色谱峰面积不得超过对照品相应提取离子流图中的峰面积(巴西对照药材溶液中巴西龟浓度相当于含有 5%巴西龟的供试品溶液浓度,生龟甲(浙龟甲)与醋龟甲(浙龟甲)检查时应用相应的生巴西龟甲与醋巴西龟甲为对照。

## 2.5 样品测定

以所建立的方法对 20 批市售龟甲(浙龟甲)样品进行检验,厂家:安徽省万生中药饮片有限公司(厂家 A),天马(安徽)中药饮片科技有限公司(厂家 B),亳州市佰世信中药饮片有限公司(厂家 C),衢州南孔中药有限公司饮片厂(厂家 D),河北誉丰药业有限公司(厂家 E),江西省玉山东港中药饮片有限公司(厂家 F),杭州桐阁堂中药饮片有限公司(厂家 G),北京同仁堂(亳州)饮片有限责任公司(厂家 H),宁波明贝中药业有限公司(厂家 I),浙江桐君堂中药饮片有限公司(厂家 J),安徽源和堂药业股份有限公司(厂家 K),嘉兴东方国药饮片有限公司(厂家 L),亳州市永刚饮片厂有限公司(厂家 M),共 13 家企业。其中 11 批次样品检出巴西龟特征成分,结果显示市场所使用的龟甲(含浙龟甲)用巴西龟甲混充或掺伪情况严重,急需对市场进行整顿。结果见表 1。

## 3 讨论

巴西龟原产于美洲,属外来物种,其适应性强、食性广且生长繁殖极其迅速,龟鳖养殖厂大量养殖,但尚未有作为药用的记载。目前,市面上龟甲的售价大大超过巴西龟龟甲,且大量正品龟甲用于熬制龟甲胶,造成市场上巴西龟充当龟甲入药情况非常严重,急需有关部门加强监管。

胶原蛋白的提取有很多方法,如碱提法、酸提法和酶提法,方法均较为复杂,龟甲含有丰富的氨基酸及胶原蛋白<sup>[10]</sup>,临床用药主要采用煎煮法,中国药典 2015 年版也规定龟甲以水溶性浸出

表 1 巴西龟特征肽检查结果表

Tab. 1 Characteristic peptide checklist of Brazilian Tortoise shell

| 序号 | 检品名称 | 标称生产单位 | 批号           | 巴西龟 |
|----|------|--------|--------------|-----|
| 1  | 龟甲   | 厂家 A   | 170101       | +   |
| 2  | 龟甲   | 厂家 A   | 161001       | -   |
| 3  | 浙龟甲  | 厂家 B   | 161227       | +   |
| 4  | 龟甲   | 厂家 C   | 160801       | +   |
| 5  | 龟甲   | 厂家 D   | 1610178      | -   |
| 6  | 龟甲   | 厂家 E   | 1611001CP128 | +   |
| 7  | 龟甲   | 厂家 F   | 1706022      | +   |
| 8  | 龟甲   | 厂家 G   | 161202       | +   |
| 9  | 龟甲   | 厂家 D   | 1611167      | -   |
| 10 | 龟甲   | 厂家 H   | 601153457    | +   |
| 11 | 龟甲   | 厂家 I   | 170422       | -   |
| 12 | 龟甲   | 厂家 A   | 170402       | -   |
| 13 | 浙龟甲  | 厂家 J   | 170302       | +   |
| 14 | 浙龟甲  | 厂家 J   | 170402       | +   |
| 15 | 龟甲   | 厂家 D   | 1704156      | -   |
| 16 | 龟甲   | 厂家 K   | 17050100     | +   |
| 17 | 浙龟甲  | 厂家 J   | 170303       | +   |
| 18 | 龟甲   | 厂家 L   | 170506       | -   |
| 19 | 龟甲   | 厂家 M   | 170329       | -   |
| 20 | 浙龟甲  | 厂家 I   | 161017       | -   |

注: - 为未检出; + 为检出。

Note: - is not detected; + is detected.

物指标作为质量控制, 部分胶原蛋白也能溶解于热水中, 因此本研究考虑方法的简便性和可操作性, 供试品提取方法是在 2015 年版中国药典龟甲浸出物提取方法基础上, 通过实验考察粉碎程度、取样量、提取时间等因素, 最终确定下来。本课题组前期研究发现, 龟甲胶特征肽肽段( $m/z$  631.3)仅能用于龟甲胶与驴皮源、牛皮源、鹿源性等胶

类成分的区别<sup>[7]</sup>, 在多种混淆品中有检出, 并不适用于正品龟甲与混淆品之间的区别。目前市场上充当正品龟甲的混淆品有 10 多种, 寻找各种龟甲混淆品各自的特征肽段还在进一步研究中。

## REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2015: 180.
- [2] 兰志琼, 黄婷慧, 卢先明, 等. 成都市龟甲药材的市场初步调查[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(4): 983-984.
- [3] 肖凌, 张飞, 康帅, 等. 龟甲本草考证及现代药用品种整理[J]. 中药材, 2018, 41(3): 740-744.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] CHENG X L, WEI F, XIAO X Y, et al. Identification of five gelatins by ultra performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry (UPLC/Q-TOF-MS) using principal component analysis [J]. J Pharm Biomed Anal, 2012(62): 191-195.
- [7] CHENG X L. Study on key technologies of quality control of glues medicines [D]. Beijing: Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2014.
- [8] CHEN J, CHENG X L, WEI F. 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.
- [9] 张贵锋, 刘涛, 王前, 等. 高效液相色谱/质谱法识别不同明胶酶解产物中特征多肽[J]. 分析化学研究报告, 2008, 36(11): 1499-1504.
- [10] LYU X N, LI M, LI H X, et al. HPLC fingerprint of Carapax et Plastrum Testudinis [J]. World Chin Med(世界中医药), 2019, 14(2): 311-314.

收稿日期: 2019-01-14

(本文责编: 沈倩)