

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

张静娴 胡 青 董洪霜 孙 健 冯 睿 于 泓 张 甦 毛秀红 季 申

(上海食品药品检验所,上海,201203)

摘要 目的:建立以特征肽为检测指标的阿胶糕中阿胶的鉴别方法与马皮、牛皮、羊皮、猪皮源成分的检测方法。方法:采用三氯乙酸沉淀法提取阿胶糕中的蛋白质,胰蛋白酶进行酶解处理,利用超高效液相色谱-三重四级杆质谱法(UHPLC-QQQ MS),电喷雾离子源(ESI),正离子模式下扫描,采用多重反应监测模式,对特征肽目标离子进行检测。结果:经验证,鉴别方法和检查方法均具有良好的专属性,灵敏度高。市售样品测定结果显示,部分样品中检出阿胶成分,有的样品中检出牛皮源成分,有的样品中未检出任何皮源性成分。结论:所建立方法操作简便,专属性强,可用于阿胶糕中阿胶的鉴别和掺假杂皮胶的检测。

关键词 阿胶;阿胶糕;超高效液相色谱-三重四级杆质谱法;多重反应检测;特征肽;蛋白质组学技术;胶原蛋白

Development of UHPLC-QQQ MS Method for Identification of Donkey-hide Gelatin Cake and Detection of Constituents from Horse, Ox, Sheep or Pig Skin

Zhang Jingxian, Hu Qing, Dong Hongshuang, Sun Jian, Feng Rui, Yu Hong, Zhang Su, Mao Xiuhong, Ji Shen

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

Abstract Objective: To establish a method for the identification of colla corii asini in donkey-hide gelatin cake and the detection of constituents from horse, ox, sheep or pig skin with characteristic peptide as the detection marker. **Methods:** The protein was extracted by trichloroacetic acid precipitation method, and trypsin was used for enzymatic hydrolysis. UHPLC-QQQ MS was used with electrospray positive ionization mode and multiple reaction monitoring (MRM) to detect the target ions. **Results:** The method was validated to be specific and sensitive. The results showed that some samples were found to be containing colla corii asini and some samples containing bovine skin ingredients, whereas some samples did not detect any skin-derived constituents. **Conclusion:** The established method was validated to be simple and specific. It can be used for identification of colla corii asini in donkey-hide gelatin cake and detection of adulteration.

Key Words Colla corii asini; Donkey-hide gelatin cake; UHPLC-QQQ MS; MRM; Characteristic peptide; Proteomics; Collagen

中图分类号:R284.1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2019.04.008

阿胶糕是以阿胶、黑芝麻、核桃仁等为主要原料,添加冰糖、黄酒等辅料,经配料、熬制等过程制成的可以即食的产品。阿胶具有补血养气、美容养颜、润肠通便、抗衰老、提高免疫力的综合保健功效,可用于失血贫血、缺铁贫血、再生障碍性贫血等^[1-6]。

近年来,随着人民生活水平的提高和保健意识的增强,阿胶市场逐年扩大,阿胶糕具有食用方便,口感好的特点,迅速在市场上崛起。随着阿胶市场的扩大,阿胶原料驴皮资源短缺,价格上涨,部分生产企业为降低成本,采用马、骡、牛、羊等价格相对低廉的皮制造阿胶,生产阿胶糕类食品,严重影响着患者和消费者的饮食用药安全。

目前关于阿胶糕类食品的质量标准较低,山东东腾阿胶有限公司的企业标准(Q/DT 0001S-2018),对总糖、水分、蛋白质、总砷、铅、酸价及过氧化值等理化指标进行限值规定^[7],2014年山东省食品药品监督管理局发布“关于进一步加强阿胶糕类食品生产许可工作有关问题的通知”,指出阿胶糕类产品不应添加明胶^[8]。颜等^[9]通过测定总氨基酸的含量来调查阿胶类保健食品中阿胶的投料量,其中6批样品未检出特异性氨基酸L-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸和L-脯氨酸,市场不容乐观,由于氨基酸作为检测指标缺乏专属性,难以对其他杂皮造假和掺假的现象进行检测和监管。因此,为了规范阿胶糕类市场,打

基金项目:上海市科学技术委员会基金项目(18DZ2292200)

作者简介:张静娴(1982.12—),女,博士,主管药师,研究方向:中药质量评价,E-mail:zhjx_2003@163.com

通信作者:季申(1963.08—),女,博士,主任药师,研究方向:中药、天然药物及保健食品和有害残留物的质量标准研究,E-mail:jishen2013@163.com

击部分企业的不良行为,保证消费者的饮食安全,急需建立阿胶糕类食品的专属性强的鉴别和检查方法。

《中华人民共和国药典》2015 年版一部收载阿胶,以特征肽为指标进行鉴别,同时测定 4 个氨基酸的含量^[10],国家食品药品监督管理局药品检验补充检验方法对牛皮源成分和铬进行检测^[11],标准实施以来,日常检验中牛皮源成分检出情况明显减少。同时文献报道了马皮源、猪皮源、羊皮源的检测方法^[12-16],均是以特征肽为指标,采用液相色谱-三重四级杆质谱联用仪进行分析,该方法专属性强,灵敏度高,对严格控制阿胶品质具有重要意义。本课题组前期采用蛋白质组学技术,以自制阿胶、马皮胶、牛皮胶、羊皮胶和猪皮胶为研究对象,采用纳流液相色谱串联高分辨质谱法采集肽段信息,通过搜索蛋白质数据库,比较阿胶与杂皮胶的肽段信息,发现马皮胶、牛皮胶、羊皮胶、猪皮胶的专属性特征肽,可作为检测指标用于阿胶及含阿胶食品和药品的鉴别与检查。因此,本课题以专属的特征肽为检测指标建立阿胶糕类食品的鉴别和检查方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 超高效液相色谱-三重四级杆质谱仪(Agilent 1290/Agilent 6495,美国 Agilent 公司)。

1.2 试剂 甲醇、乙腈均为色谱纯(德国 Merck 公司)、甲酸为色谱纯(美国 Fisher 公司),胰蛋白酶为测序级(美国 Promega 公司),水为去离子水(Milli-Q 纯水系统生产),碳酸氢铵为分析纯(上海国药集团)。

1.3 分析样品 对照药材与对照品:阿胶(批号

121274-201202)对照药材由中国食品药品鉴定研究院提供,马皮特征肽、牛皮特征肽、羊皮特征肽和猪皮特征肽对照品均由吉尔生化(上海)有限公司合成,纯度均大于 98%。

样品:研究用阿胶糕样品为实验室自制,同时自制阿胶糕阴性样品。最终检测的 10 批阿胶糕为市售样品。

2 方法与结果

2.1 特征肽及检测离子的确定 参照阿胶药材质量控制方法,选择《中华人民共和国药典》2015 年版一部中阿胶鉴别用检测离子,即 m/z 539.8→924.5, 612.3(见表 1),用于建立阿胶糕中阿胶的鉴别方法。同时参考文献^[12-13],采用蛋白质组学技术,提取阿胶及马、牛、羊和猪自制胶中的胶原蛋白,进行酶解,采用纳流液相色谱串联高分辨质谱法(UltiMate 3000 Nano RSLC-Orbitrap Fusion Lumos HRMS)采集肽段信息,采用 Proteome Discoverer 2.2 软件通过搜索各个物种相应的蛋白质数据库(驴:NCBI Equus asinus protein;马:uniprot horse_UP000002281;牛:uniprot Bovine_UP000009136;羊 uniprot sheep_UP000002356 猪:uniprot pig_UP000008227),进行蛋白质和多肽的鉴定,比较阿胶与杂皮胶的肽段信息,寻找马皮胶、牛皮胶、羊皮胶、猪皮胶的专属性特征肽。见表 1。正离子模式下的二级扫描质谱图如图 1 所示,主要是酰胺键断裂后产生的 b 离子和 y 离子,对主要的碎片离子进行了归属。选择响应好且相对稳定的离子对作为检测指标,采用超高效液相色谱串联三重四级杆质谱法对各离子的碰撞能量进行了优化,特征肽序列及质谱离子信息见表 1。

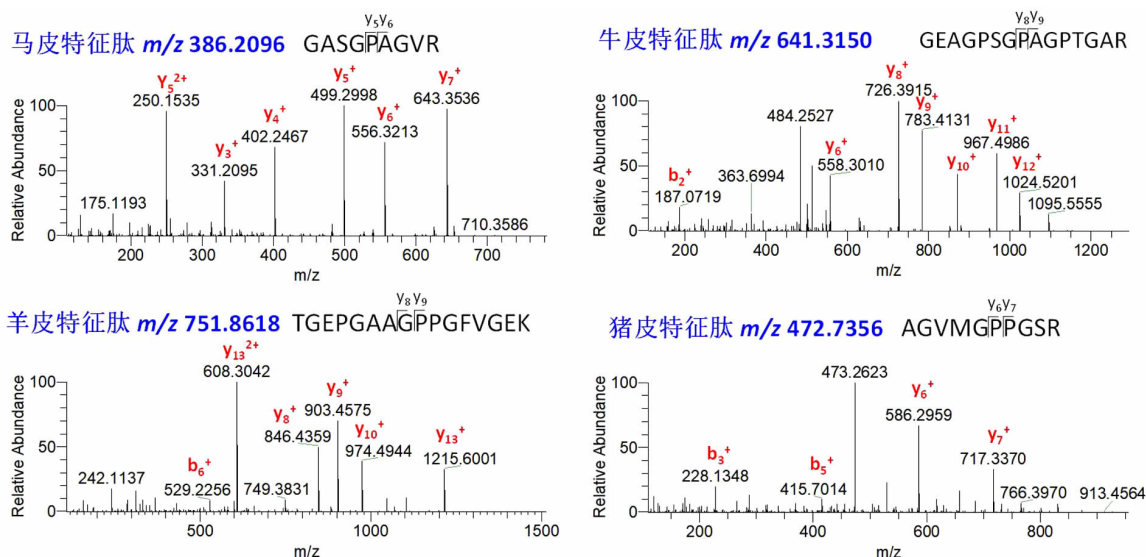


图 1 高分辨质谱正离子模式下各特征肽的二级扫描质谱及主要碎片离子归属

2.2 液相色谱-质谱条件 色谱柱: Waters CORTECS T3 C₁₈ 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 2.7 μm), 流速 0.4 mL/min, 柱温 30 ℃, 流动相: A 为 0.1% 甲酸溶液, B 为含 0.1% 甲酸的乙腈溶液; 梯度洗脱程序: 0 ~ 15 min, 95% A → 80% A, 5% B → 20% B; 进样量: 1 μL。

离子源: 电喷雾离子源 (ESI), 正离子扫描模式; 离子源温度: 200 ℃, 毛细管电压: 4 000 V, 干燥器流量: 12 L/min; 雾化器压力: 25 psi; 鞘气温度: 250 ℃; 鞘气流量: 10 L/min; 喷嘴电压: 500 V; 采用多重反应监测 (MRM) 模式检测。特征肽的母离子、子离子和碰撞能量 (CE) 等信息见表 1。

表 1 特征肽序列及质谱离子信息

物种来源	特征肽序列	母离子 (m/z)	母离子电荷	子离子 (m/z)	碰撞能量 (CE)
驴	GPPGAAGPPGLR	539.8	2 +	924.5	21
	(2 hydroxylation)			612.3	21
马	GASGPAGVR	386.3	2 +	499.1	16
				643.3	16
牛	GEAGPSGPAGPTGAR	641.3	2 +	783.3	29
				726.2	29
羊	TGEPGAAGPPGFVGEK	751.9	2 +	903.5	29
	(2 hydroxylation)			846.6	37
猪	AGVMGPPGSR	473.0	2 +	718.2	21
	(1 hydroxylation)			586.3	13

2.3 样品溶液的制备

2.3.1 阿胶对照药材溶液的制备 按照《中华人民共和国药典》2015 年版一部“阿胶”鉴别项下制备阿胶对照药材溶液。取对照药材 0.1 g, 加 1% 碳酸氢铵溶液 50 mL, 超声处理 30 min, 用微孔滤膜滤过, 取续滤液 100 μL, 加胰蛋白酶溶液 (1 μg/μL) 10 μL, 摇匀, 37 ℃ 恒温酶解 12 h, 即得。

2.3.2 样品溶液的制备 取阿胶糕适量, 去除易分离的其他食材 (如花生、核桃等) 后, 取胶类部位 1 g, 加适量水超声 30 min 使溶解, 离心, 取上清液, 加入等量预冷的 20% 三氯乙酸溶液, 充分振荡后于 4 ℃ 放置 30 min, 离心, 弃去上清, 取沉淀, 用预冷丙酮 2 mL 洗涤, 离心, 弃去丙酮液, 再用 2 mL 预冷丙

酮重复洗涤一次, 挥干丙酮, 得蛋白提取物。于提取物中加入 1% 碳酸氢铵溶液使溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 用 1% 碳酸氢铵溶液稀释至刻度, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取 100 μL 续滤液, 加入 10 μL 胰蛋白酶溶液 (1 μg/μL), 摇匀, 37 ℃ 恒温酶解 12 h, 即得。

2.3.3 用于杂皮源成分检测的对照品溶液制备

取研究用自制阿胶糕, 按照样品溶液的制备方法得阿胶糕基质溶液。分别取马、牛、羊、猪特征肽适量, 加阿胶糕基质溶液制成各特征肽质量浓度为 1 μg/mL 的溶液, 作为标准储备溶液。系列标准溶液用阿胶糕基质溶液配制, 现用现配。取各标准溶液 100 μL, 加胰蛋白酶溶液 (1 μg/μL) 10 μL, 摇匀, 37 ℃ 恒温酶解 12 h, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 阿胶糕中阿胶鉴别 专属性考察: 以不含阿胶的自制糕为阴性样品, 以阿胶对照药材和阿胶糕为阳性样品, 选择特征离子峰 m/z 539.8 → 612.4 和 m/z 539.8 → 923.8 作为检测离子对进行测定, 结果阴性样品中的色谱图中 (图 2), 在与阿胶对照药材及阿胶糕相应的位置上无相应色谱峰, 说明方法的专属性良好。

检测限考察: 自制阿胶糕, 使阿胶含量分别占总量的 0.1%、0.5%、1.0%, 按照样品制备方法提取蛋白、酶解成肽段后, 对阿胶特征肽离子对 m/z 539.8 → 924.5, 612.3 进行检测, 结果显示, 阿胶含量为 0.1% 时可检测到相应离子对。

2.4.2 阿胶糕中马皮、牛皮、猪皮、羊皮源成分的检测 专属性考察: 以自制马皮胶、牛皮胶、猪皮胶和羊皮胶为阳性样品, 以自制阿胶糕为阴性样品, 选择各杂皮胶特征肽检测离子对进行测定, 结果见图 3。在阳性样品中, 各特征肽对照品相应保留时间位置上均呈现出特征肽离子流色谱峰。而阿胶样品色谱图中, 在与马皮胶、牛皮胶、猪皮胶和羊皮胶相应特征肽的保留时间位置未检出色谱峰, 说明各杂皮胶的特征肽专属性良好。

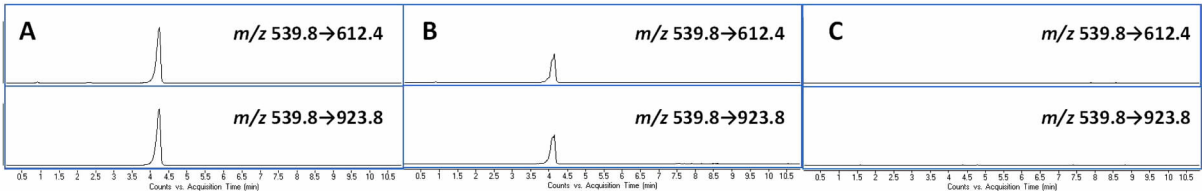


图 2 阿胶糕中阿胶的鉴定专属性考察色谱图

注: A. 阿胶对照药材; B. 阿胶糕; C. 阴性样品

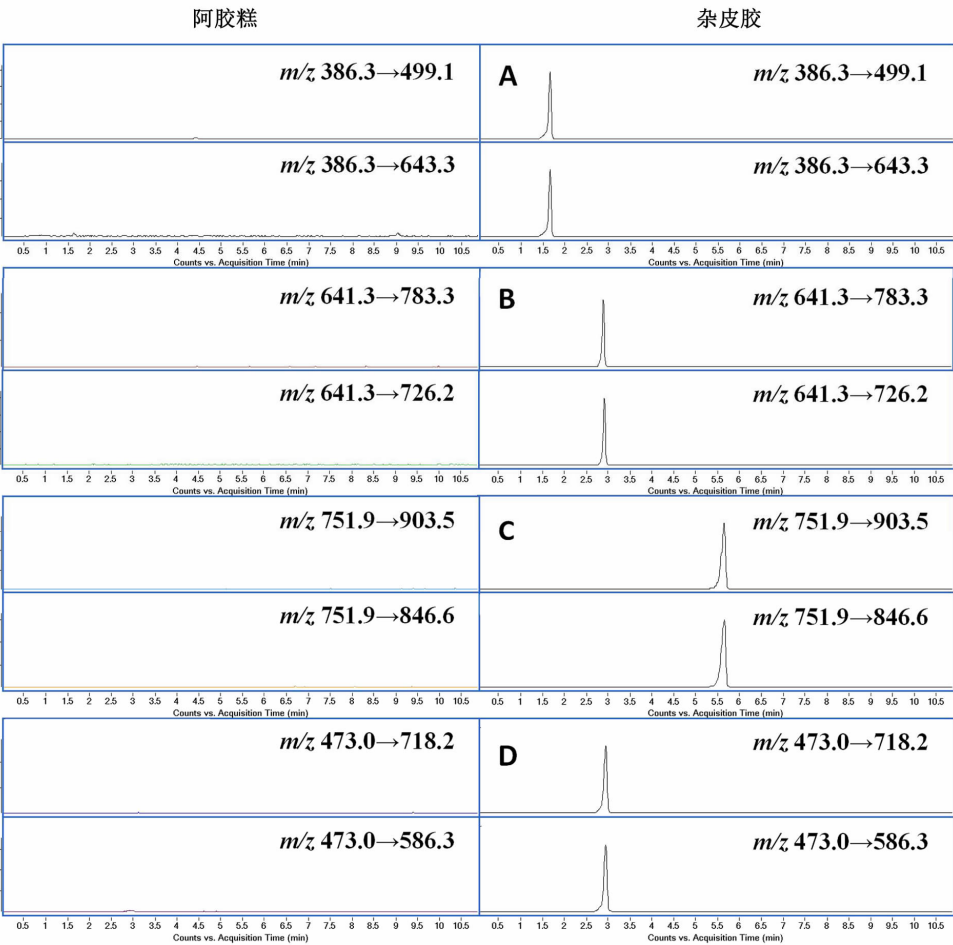


图 3 阿胶糕中杂皮胶检测专属性考察色谱图

注:A-自制马皮胶;B-自制牛皮胶;C-自制羊皮胶;D-自制猪皮胶

检测限考察:取系列标准溶液进样,以峰面积为纵坐标,各特征肽浓度为横坐标,绘制标准曲线,结果表明各组分在 0.01 ~ 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。在阿胶糕基质溶液中加入适量的杂皮胶特征肽混合标准溶液后,按照方法进样检测,以信噪比为 3 计算检测限,结果显示马、牛、羊、猪特征肽的检测限分别为 0.8、1.1、0.9、1.2 $\mu\text{g/kg}$ 。

2.5 样品测定结果 以所建立的方法对市场上购买的阿胶糕进行检验,结果表明,10 批样品中,有 5 批检出阿胶成分,未检出其他皮源性成分;有 2 批样品检出牛皮源成分,另外 3 批未检出任何皮源性成分,可能是未投料或者投料过少,低于目前检测限。

3 讨论

阿胶及各杂皮胶主要成分均为胶原蛋白,同源性高,近年来,以特征肽为检测指标,采用液相色谱-质谱联用技术建立胶类中药质量控制方法,得到了广泛应用,该方法具有专属性强,灵敏度高的优点^[15-19]。但是,如何选择专属性强特征肽是方法开发的关键因素^[20],本研究前期采用纳流液相色谱

串联四极杆-静电场轨道阱-线性离子阱三合一组合式高分辨质谱仪 (nanoLC/Orbitrap Fusion Lumos HRMS)对自制阿胶、马皮胶、羊皮胶和猪皮胶的酶解产物进行分析,采用蛋白质搜库软件,搜索相应物种的蛋白数据库,鉴定主要蛋白质和肽段,并对阿胶及杂皮胶进行了比较,选择其中每个物种专属的特征肽,作为检测指标,来建立阿胶糕中掺假杂皮胶的检测方法。

阿胶糕中除阿胶原料外,还含有芝麻、花生、核桃仁、冰糖,黄酒等,样品基质复杂,因此需要考察胶原蛋白的提取和富集方法。实验首先按照阿胶药材鉴别中的供试品制备方法,即直接取样,约相当于阿胶含量 0.1 g,用 1% 碳酸氢铵 50 mL 超声 30 min,过滤,取滤液 100 μL 酶解后进行分析,发现目标特征肽信号非常弱,由于样品中的糖类、油脂及其他蛋白质会一同提取出来,这些成分对酶解效率和质谱响应可能有抑制作用,因此,实验进一步考察了富集蛋白质的方法,首先剥离除去花生、核桃仁等体积较大的成分,从而去除一部分油脂,取胶类部位样品,

用水超声溶解后,加入等体积预冷的 20% 三氯乙酸低温沉淀蛋白,用预冷丙酮洗涤沉淀,从而获得蛋白提取物,酶解后进样分析,发现质谱响应明显提高。

参考文献

- [1] Wu HZ, Ren CY, Yang F, et al. Extraction and identification of collagen-derived peptides with hematopoietic activity from Colla Corii Asini [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 182 (8) : 129-136.
- [2] Liu M, Tan H, Zhang X, et al. Hematopoietic effects and mechanisms of Fufang ejiao jiang on radiotherapy and chemotherapy-induced myelosuppressed mice [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 152 (3) : 575-584.
- [3] 王璐, 李祥雯, 侯燕. 蔗糖铁注射液与复方阿胶浆用于产后贫血治疗的大样本随机对照研究 [J]. 河北医药, 2017, 39 (2) : 242-246.
- [4] Li Y, He H, Yang L, et al. Therapeutic effect of Colla corii asini on improving anemia and hemoglobin compositions in pregnant women with thalassemia [J]. Int J Hematol, 2016, 104 (5) : 559-565.
- [5] 张路, 朱海芳, 陈慧慧, 等. 复方阿胶浆对小鼠抗疲劳能力的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (19) : 254-257.
- [6] Shen LJ, Chen HL, Zhu QF, et al. Identification of bioactive ingredients with immuno-enhancement and anti-oxidative effects from Fufang-Ejiao-Syrup by LC-MSⁿ combined with bioassays [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 117 (1) : 363-371.
- [7] 山东东阿阿胶有限公司企业标准 (Q/DT 0001S-2018) [S], 2018.
- [8] 山东省食品药品监督管理局. 关于进一步加强阿胶糕类食品生产许可工作有关问题的通知 [Z]. 2014.
- [9] 颜琳琪, 谢升谷, 李樱红, 等. 阿胶类保健食品中阿胶真实含量调查 [J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23 (15) : 3122-3123.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [S]. 1 部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 189.
- [11] 国家食品药品监督管理总局药品补充检验方法和检验项目批准件 (2012001) [Z]. 2013.
- [12] 杭宝建, 田晨颖, 陈晓, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定阿胶中马、牛、羊、猪、骆驼、鹿皮源成分 [J]. 色谱, 2018, 4 (36) : 408-412.
- [13] Xue L, Feng S, Gong L, et al. Species-specific identification of collagen components in CollaCoriiAsini using a nano-liquid chromatography tandem mass spectrometry proteomics approach [J]. Inter J Nanom, 2017, 12: 4443-4454.
- [14] 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.
- [15] 巩丽萍, 石峰, 李雪, 等. 一种羊特征性多肽及其应用: 中国, CN106093244A [P]. 2016-11-09.
- [16] 杭宝建, 邢晨, 由鹏飞, 等. 一种猪源性特征肽及其在猪皮和阿胶定性检测中的应用流程: 中国, CN106589114A [P]. 2017-04-26.
- [17] 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 (2) : 191-195.
- [18] 龙国友, 李明华, 刘薇, 等. 超高效液相色谱-三重四极杆质谱法检测阿胶补血颗粒中的阿胶 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36 (5) : 826-829.
- [19] 陈佳, 称显隆, 魏锋, 等. 超高效液相色谱-三重四极杆质谱法检测复方阿胶浆中阿胶 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35 (2) : 328-332.
- [20] 董洪霜, 张静娴, 胡青, 等. 胶类中药质量控制研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49 (13) : 3166-3173.

(2019-03-10 收稿 责任编辑: 徐颖)

(上接第 827 页)

- [12] Yoshioka N, Ichihashi K. Determination of 40 synthetic food colors in drinks and candies by high-performance liquid chromatography using a short column with photodiode array detection [J]. Talanta, 2008, 74 (5) : 1408-1413.
- [13] 林维宣, 孙兴权, 赵雪蓉, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时检测化妆品中 6 种禁用着色剂 [J]. 色谱, 2012, 30 (5) : 527-532.
- [14] Feng F, Zhao Y, Yong W, Sun L, Jiang G, Chu X. Highly sensitive and accurate screening of 40 dyes in soft drinks by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2011, 879 (20) : 1813-1818.
- [15] 张东雷, 汪丽娜, 陈小珍, 等. 超快速液相色谱-离子阱飞行时间质谱法测定肉制品中 10 种碱性染料 [J]. 色谱, 2012, 30 (8) : 770-776.
- [16] 赵延胜, 杨敏莉, 张峰, 等. 液相色谱/四极杆-飞行时间质谱法筛查奶酪中 29 种禁用和限量合成色素 [J]. 色谱, 2011, 29 (7) : 631-636.
- [17] Jian S, Rui F, Qing H, Hong Y, Su Z, Lin F, et al. Simultaneous de-termination of sixteen synthetic acid pigments in medicinal Chinese herbs by polyamide SPE-HPLC [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2015, 37 : 1031-1036.
- [18] Hu Q, Sun J, Yu H, Zhang S, Feng R, Ji S. Qualitative analysis of 50 pigments in dyed herb by UHPLC/QTOF [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2016, 51 (15) : 1316-1323.
- [19] Li XQ, Zhang QH, Ma K, Li HM, Guo Z. Identification and determination of 34 water-soluble synthetic dyes in foodstuff by high performance liquid chromatography-diode array detection-ion trap time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. Food Chem, 2015, 182 : 316-326.
- [20] 冯月超, 贾丽, 何亚荟, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定粮食及肉制品中的 24 种工业染料 [J]. 色谱, 2013, 31 (10) : 1021-1027.
- [21] 尹峰, 丁召伟, 杨志坚. 固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法检测香辛料中罗丹明 B [J]. 色谱, 2012, 30 (7) : 672-676.

(2019-03-10 收稿 责任编辑: 徐颖)