

质量分析

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^{*}巩丽萍¹, 杭宝建¹, 迟连利², 李雪², 徐丽华¹, 魏峰³, 程显隆³, 马双成^{3**}, 石峰^{1**}

(1. 山东省食品药品检测研究院, 济南 250101; 2. 山东大学, 济南 250100; 3. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要 目的: 发现马皮特征肽, 建立阿胶中马皮源成分专属性的检测方法。方法: 采用序列比对技术发现理论马皮胶原蛋白特征肽, 利用胰蛋白酶酶切马皮胶样品, 通过纳升液相-高分辨质谱确证了马皮特征肽 GASGPAGVR。利用超高效液相色谱-三重四极杆质谱(UPLC-QQQ/MS)对马皮特征肽进行检测。色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm × 150 mm, 1.7 μm), 流动相为 0.1% 甲酸溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0~3 min, 96%A; 3~8 min, 96%A → 92%A; 8~10 min, 92%A → 50%A; 10~12 min, 50%A; 12~12.1 min, 50%A → 96%A; 12.1~15 min, 96%A), 流速 0.3 mL·min⁻¹, 柱温 40 °C, 进样量 5 μL; 离子化模式为 ESI⁺, 进行多反应监测, 选择马皮特征肽特征分子离子峰 *m/z* 386.25 → 499.25, *m/z* 386.25 → 556.51 作为检测离子对。结果: 在马皮胶样品中检出了马皮特征肽, 在阿胶、牛皮胶、猪皮胶、羊皮胶样品中均未检出马皮特征肽。该方法的检出限度为 1% 马皮胶的阿胶样品。对 10 批阿胶样品进行检测, 在 2 批样品中检出了马皮特征肽。结论: 所建立的方法经验证, 专属性强, 可用于阿胶中马皮源成分的检测。

关键词: 序列比对; 液质联用技术; 阿胶鉴别; 马皮胶; 马皮特征肽

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2018)02-0364-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.02.27

Identification of the horse skin marker peptide for test of horse-hide gelatin in donkey-hide gelatin^{*}GONG Li-ping¹, HANG Bao-jian¹, CHI Lian-li², LI Xue², XU Li-hua¹,
WEI Feng³, CHENG Xian-long³, MA Shuang-cheng^{3**}, SHI Feng^{1**}

(1. Shandong Institute of Food and Drug Control, Jinan 250101, China; 2. Shandong University, Jinan 250100, China;

3. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To find marker peptide of horse hide and establish a specific method for identification of horse-hide gelatin in donkey-hide gelatin. **Methods:** Theoretical species-specific peptide of horse skin was predicted by sequence comparison as GASGPAGVR, which was verified by Nano LC-Orbitrap MS followed by sample digestion with trypsin. Ultra-high performance liquid chromatography coupled with triple quadruple mass

* 国家重大新药创制中药安全检测技术及标准平台(No.2014ZX09304307)——中药质量安全检测和风险控制技术平台(No.2014ZX0930437-002)

** 通信作者 马双成 Tel:(010)67095424; E-mail: masc@nicpbp.org.cn

石峰 Tel:(0571)81216563; E-mail: 13953175123@139.com

第一作者 Tel:(0531)81216561; E-mail: gongliping_lp@163.com

spectrometry (UPLC-QQQ/MS) was used to detect horse-hide marker peptide. Determination was carried out on an ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm × 150 mm, 1.7 μm) column at temperature of 40 °C. The mobile phase was composed of 0.1% formic acid (A) and acetonitrile (B) with gradient elution (0–3 min, 96%A; 3–8 min, 96%A → 92%A; 8–10 min, 92%A → 50%A; 10–12 min, 50%A; 12–12.1 min, 50%A → 96%A; 12.1–15 min, 96%A) at a flow rate of 0.3 mL · min⁻¹. The electrospray ionization (ESI) source was performed in multiple reaction monitoring (MRM) mode with the transitions of *m/z* 386.25 → 499.25 and *m/z* 386.25 → 556.51. **Results:** Marker peptide was found in horse hide gelatin, but not in donkey hide gelatin, cow hide gelatin, pig hide gelatin nor sheep hide gelatin. The detection limit is 1% horse hide gelatin in donkey hide gelatin. Marker peptide was detected in 2 out of 10 donkey-hide gelatin samples. **Conclusion:** The established method is proved to be specific, which is suitable for the identification of horse-hide gelatin in donkey-hide gelatin.

Keywords: sequence comparison; LC-MS; authentication of donkey-hide gelatin; horse-hide gelatin; marker peptide of horse hide

2015年版中国药典规定阿胶由驴皮熬制而成^[1]。阿胶具有补血滋阴,润燥,止血的功效^[2-4]。阿胶由于其良好的疗效,广受欢迎,但是生产原料驴皮供应量的限制,导致阿胶价格昂贵,阿胶药材的掺伪造假问题严重。马与驴同属马科动物^[5],马皮和驴皮形态相似,难以区分。我国马的存栏量大,马皮的价格便宜,常被用于冒充驴皮制作阿胶^[6,7]。

PCR技术被广泛地用于食品药品源性的检测,但是由于阿胶是驴皮经过高温处理后的产物,其中的DNA破坏严重^[8],限制了PCR技术在阿胶源性成分检测中的应用。阿胶中的主要成分是驴皮胶原蛋白高温不完全水解后的肽段^[9]。不同物种的蛋白序列存在差异,胰蛋白酶识别多肽链中的赖氨酸和精氨酸切割多肽链^[10]。不同物种的蛋白序列经胰蛋白酶酶切后可能形成物种特异性的多肽,利用蛋白酶酶切技术和质谱技术进行胶原蛋白物种源性的方法已经比较成熟^[11-14]。利用质谱技术和主成分分析的方法发现了牛皮胶原蛋白特征肽,建立了胶类药材中牛皮源成分的专属性的检测方法,有效地打击了阿胶中掺入牛皮源成分的违法行为^[15-18]。但是尚未发现相对于驴的马皮特征肽,用于阿胶中马皮源成分的检测。本研究通过比对马和驴、猪、牛、羊胶原蛋白的序列,模拟胰蛋白酶酶切的结果,获得了一条理论的马皮胶原蛋白特征肽,通过合成马皮特征肽在高分辨质谱上得到了进一步确证,并进一步采用超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪建立了阿胶中马皮源成分的专属性鉴别方法,并进行了方法学验证。

1 仪器与材料

1.1 仪器 EASY-nLC 1000 纳升液相色谱仪(美国热电科技公司), Thermo Scientific 公司 Fusion-Orbitrap 高分辨质谱(美国热电科技公司);自制纳升液相色谱富集色谱柱(0.2 mm × 3.5 cm, 填料:十八烷基硅烷键合硅胶,孔球形硅胶粒径 5 μm, 德国迈克公司), 自制纳升液相色谱分析色谱柱(75 μm × 25 cm, 填料:十八烷基硅烷键合硅胶,孔球形硅胶粒径 3 μm, 德国迈克公司)。Waters Acquity 超高效液相色谱仪、Waters Quattro Premier XE 三重四极杆质谱(美国沃特世科技公司), 色谱柱: Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm × 150 mm, 1.7 μm, 填料:十八烷基硅烷键合硅胶,桥式亚乙基杂化颗粒)(美国沃特世科技公司)。KQ200DB 超声清洗仪(中国昆山超声仪器有限公司)。XSE205 电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司)。

1.2 试剂 甲酸、乙腈为色谱纯,水为 Milli-Q 纯水;胰蛋白酶酶自 Sigma 公司, 货号为 T1426-100 mg, 马皮特征肽由上海强耀生物有限公司合成,纯度为 98%。

1.3 胶类样品 6 份马皮胶(1-6 号)、3 份骡皮胶(1-3 号)、3 份阿胶(1-3 号)、3 份猪皮胶(1-3 号)、3 份牛皮胶(1-3 号)、3 份羊皮胶(1-3 号)按以下制备工艺获得:取鲜皮 10 g, 去毛,水浸泡 4 d, 每天换水 2 次, 1% 碳酸钠水溶液浸泡 1 d, 水洗净,加水 90 mL, 115 °C 熬制 8 h 获得胶液,胶液滤过,滤液浓缩成稠膏, 100 °C 真空干燥箱干燥 4 h 获得胶。阿胶样品由生产厂家提供,具体信息见表 1。

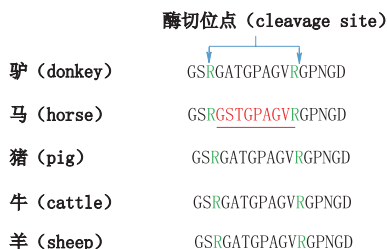
表 1 阿胶样品信息

Tab. 1 Information of sample

序号 (No.)	生产厂家 (manufacturer)	生产批号 (lot No.)
1	A	1508045
2	A	1508046
3	A	1508039
4	B	160304
5	B	160303
6	C	15070222
7	D	150309
8	E	150039
9	F	201409002
10	G	20150307

2 方法与结果

2.1 理论的马皮特征肽的发现 阿胶中的主要成分为驴皮胶原蛋白水解后的多肽。皮类胶原蛋白主要由 I 型胶原蛋白组成,占胶原蛋白总量的 80%~85%,I 型胶原蛋白又包括 I 型 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 亚型。通过对马与驴、猪、牛、羊的 I 型 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 胶原蛋白序列进行 blast 多序列比对,发现马的胶原蛋白 COL I $\alpha 2$ 序列与其他物种之间的差异(图 1);通过模拟胰蛋白酶酶切马胶原蛋白获得一条理论的马相对于驴、猪、牛、羊的特征肽,序列为 GASGPAGVR,对应马皮胶原蛋白 COL I $\alpha 2$ 的第 423~431 个氨基酸。

图 1 胶原蛋白 COL I $\alpha 2$ 序列比对Fig. 1 Sequence alignment of collagen I $\alpha 2$

2.2 供试品溶液的制备 精密称定胶类药材 0.10 g,置 50 mL 量瓶中,加 1% NH_4HCO_3 溶液 40 mL,超声 (100 W, 40 kHz) 处理 30 min,使样品完全溶解并加 1% NH_4HCO_3 溶液定容至刻度,过 0.22 μm 的滤膜,取 100 μL 液至 200 μL 微量进样瓶中,加 2 μL

胰蛋白酶溶液(取序列分析纯胰蛋白酶适量,加 1% NH_4HCO_3 溶液溶解,制成每 1 μL 中含 20 μg 胰蛋白酶的溶液),摇匀,37 $^\circ\text{C}$ 恒温酶解 16 h,注入液相色谱-质谱联用仪分析。

2.3 纳升液相色谱和 Fusion–Orbitrap 高分辨质谱条件 采用 EASY–nLC 1000 纳升液相色谱系统分离。流动相 A 为 2% 的乙腈和 0.1% 甲酸水溶液;流动相 B 为 98% 的乙腈和 0.1% 甲酸水溶液。洗脱梯度设置见表 2,进样量为 1 μL 。采用自制纳升液相色谱富集色谱柱进行脱盐富集,采用实验室自制纳升分离色谱柱进行分析。

表 2 高分辨质谱 – 纳升液相梯度洗脱表

Tab. 2 Gradient elution program of NanoLC

时间 (time) / min	流速 (flow rate) / ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)	流动相 (mobile phase)	
		A/%	B/%
0	300	100	0
15	300	93	7
70	300	78	22
90	300	65	35
95	300	10	90
96	450	10	90
105	450	10	90

采用 Thermo Scientific 公司 Fusion–Orbitrap 高分辨质谱仪,离子源为 Nanospray Flex 纳喷源。采用正离子模式进行分析,喷雾电压为 2.1 kV,离子传输毛细管温度为 275 $^\circ\text{C}$,S–Lens 传输效率设置为 60%。一级质谱采用 Orbitrap 作为质量分析器,分辨率为 60 000 ($m/z = 400$),采集范围为 350~1 650 Th。二级质谱采用离子阱作为质量分析器,采用 Rapid Scan 模式进行扫描,利用 Top20 数据依赖模式进行母离子选择,采用 CID 模式进行碎裂,碎裂能量 NCE 设置为 35%。

2.4 超高效液相和三重四极杆质谱条件 采用 Waters Acquity 超高效液相系统,色谱柱为 ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ (十八烷基硅烷键合硅胶,2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7 μm),流速 0.3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,流动相 A 为 0.1% 甲酸溶液,B 为 0.1% 甲酸乙腈,梯度洗脱,流动相条件见表 3,进样量 5 μL 。

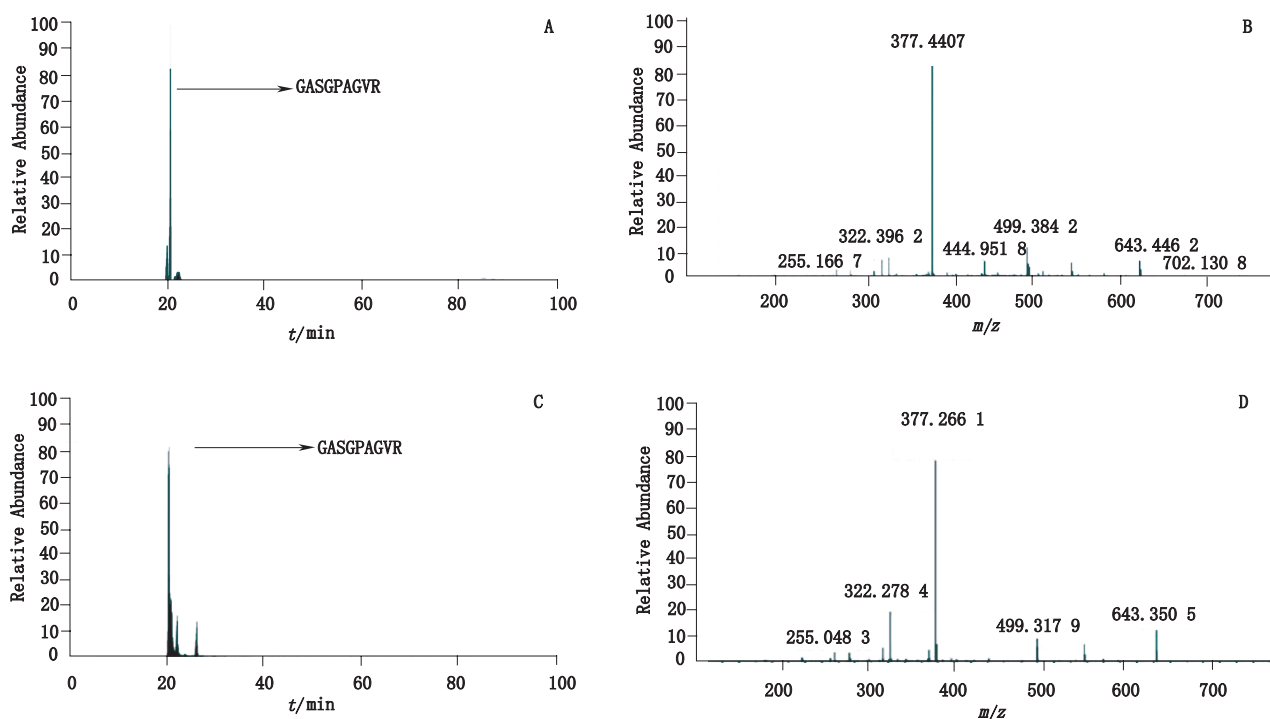
表 3 超高效液相流动相条件

Tab. 3 Gradient elution program of UPLC

时间 (time)/min	流动相 (mobile phase)	
	A/%	B/%
0	96	4
3	96	4
8	92	8
10	50	50
12	50	50
12.1	96	4
15	96	4

采用 Waters Quattro Premier XE 三重四极杆质谱系统,电喷雾离子化 (ESI),正离子模式下,进行多反应监测,选择 386.25 → 499.25, 556.51 作为检测离子对。

2.5 马皮特征肽的验证 采用供试品溶液制备方法制备的 1 号马皮胶样品注入 EASY-nLC 1000 纳升液相色谱 - Fusion-Orbitrap 高分辨质谱联用仪分析,以马胶原蛋白序列为数据库,将马皮胶酶解后的多肽质谱信息用 SEQUEST 软件进行数据库搜索,证实了马皮特征肽的存在。马皮胶样品和合成的马皮特征肽的 EIC、二级质谱如图 2 所示,合成的马皮特征肽选择离子色谱峰与样品中的待检色谱峰的保留时间一致;二级质谱图也一致。马皮特征肽二级质谱碎片信息归属与理论一致 (见图 3),进一步验证为马皮特征肽。



A、B. 马皮胶样品中的马皮特征肽 (marker peptide in horse hide gelatin) C、D. 合成的马皮特征肽 (synthetic marker peptide)

图 2 马皮特征肽的 EIC 和二级质谱图

Fig. 2 The extracted ion chromatogram and MS/MS spectra of marker peptide of horse hide

2.6 专属性试验 按供试品溶液制备方法制得马皮胶 (6 份)、骡皮胶 (3 份)、阿胶 (3 份)、猪皮胶 (3 份)、牛皮胶 (3 份)、羊皮胶 (3 份) 供试品溶液,注入超高效液相色谱和三重四极杆质谱仪平行测定,检测结果如图 4 所示,马皮特征肽的分子离子峰只在马皮胶和骡皮胶中出现。以上结果说明马皮特征肽是马和骡特有的成分,可以用于阿胶中马源性和骡皮源成

分的检测,具有很强的专属性。

2.7 检测限 取 1 号马皮胶样品,加阿胶基质溶液 (取自制 1 号阿胶样品 0.10 g,置 50 mL 量瓶中,加 1% NH_4HCO_3 水溶液 40 mL,超声处理 30 min,使样品完全溶解并加 1% NH_4HCO_3 水溶液定容至刻度,摇匀,即得) 分别制得含 0.5%、1%、5%、10%、20% 的马皮胶系列样品溶液,以马皮特征肽的分子离子峰 m/z 386.25 →

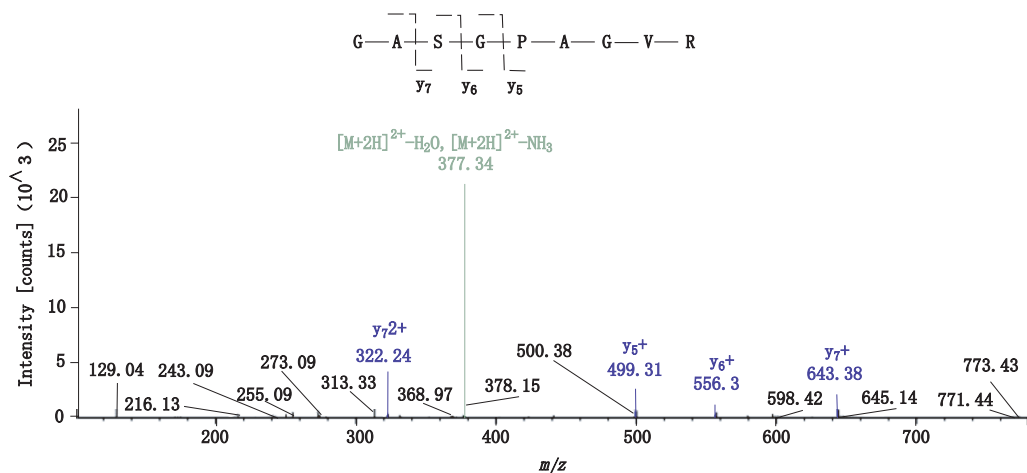
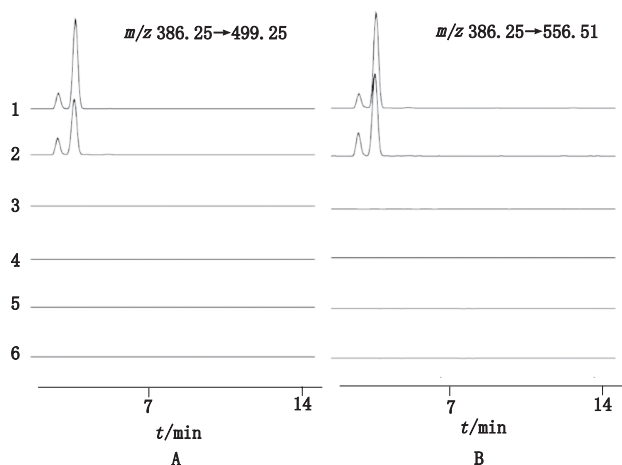


图3 马皮特征肽离子碎片信息归属

Fig. 3 Elucidation of marker peptide of horse hide fragment ion



1. 马皮胶 (horse hide gelatin) 2. 骡皮胶 (mule hide gelatin) 3. 牛皮胶 (cow hide gelatin) 4. 猪皮胶 (pig hide gelatin) 5. 羊皮胶 (sheep hide gelatin) 6. 阿胶 (donkey hide gelatin)

A. m/z 386.25 → 499.25 B. m/z 386.25 → 556.51

图4 马皮特征肽的 MRM 色谱图

Fig. 4 MRM chromatograms of marker peptide of horse hide

499.25, 556.51 作为检测离子对进行检测,含 1% 的马皮胶样品中马皮特征肽的特征分子离子峰的信噪比为 4.39,利用马皮特征肽检测阿胶中马皮源成分的检出限为 1% 马皮胶的阿胶样品。

2.8 稳定性试验 取 1 号马皮胶样品制备样品溶液,以 m/z 386.25 → 499.25, 556.51 作为检测离子进行检测,分别于 0、2、4、8、16、24 h 测定,马皮特征肽的 RSD ($n=6$) 为 2.7%。结果表明:供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.9 重复性试验 取 1 号马皮胶样品平行制备 6 份供试品溶液,以 m/z 386.25 → 499.25, 556.51 作

为检测离子对进行检测,马皮特征肽的 RSD ($n=6$) 为 2.37%。结果表明:6 份样品的测定具有较好的重复性。

2.10 样品测定 生产厂家提供的 10 份阿胶样品,以 2015 年版中国药典检验全部合格,以所建立的方法对 10 份阿胶样品进行了检测,生产厂家 F 批号为 201409002 和生产厂家 G 批号为 20150307 的 2 批阿胶样品检出了马皮特征肽。

3 讨论

3.1 马皮特征肽检测阿胶中的骡皮源成分 骡皮的形态与驴皮非常相似,常被冒充驴皮熬制阿胶。专属性实验显示在骡皮胶中可以检出马皮特征肽,原因是骡是马和驴杂合体,骡含有驴和马的遗传信息,骡含有马的胶原蛋白。如果在阿胶中掺入了骡皮源成分,利用马皮特征肽的检测方法亦可以检出。

3.2 结论 中国药典 2015 年版中检验项目主要包括:性状,鉴别,水分,总灰分,铅、镉、砷、汞、铜,羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸,驴源性成分鉴别;国家食品药品监督管理总局药品检验补充检验方法和检验项目批准件(批准件编号:014014)中牛皮源成分检测。现有标准检测项中无马皮源性成分检测,10 份市售阿胶样品均符合标准。而以本文所建立的马皮源成分检测方法进行检测,有 2 份阿胶样品检出了马皮源成分,说明阿胶行业利用马皮或骡皮掺假的现象严重。本文所建立的马皮源检测方法可以为建立阿胶中马皮源成分检验标准提供技术依据,在药品、保健食品、食品的质量控制和市场监管领域有很好的应用前景,对打击阿胶产业的造假行为,促进产业健康发展,保障消费者合法权益有重要的意义。

参考文献

- [1] 中国药典 2015 年版. 一部[S]. 2015: 189
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 189
- [2] 尤金花, 田守生, 郭尚伟, 等. 阿胶及其疗效功能的研究进展[J]. 明胶科学与技术, 2009, 29(4): 169
YOU JH, TIAN SS, GUO SW, *et al.* Advances in the study of Ejiao and its curative effects[J]. Sci Technol Gelatin, 2009, 29(4): 169
- [3] 刘茂玄, 罗洁, 王东亮, 等. 复方阿胶浆对肾性贫血大鼠的治疗作用及其机制[J]. 中草药, 2014, 45(3): 380
LIU MX, LUO J, WANG DL, *et al.* Therapeutic effects of Fufang Ejiao Jiang on renal anemia rats and its mechanisms[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2014, 45(3): 380
- [4] 郑筱祥, 杨勇, 叶剑锋, 等. 东阿阿胶的升白作用及机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2005, 22(2): 102
ZHENG XX, YANG Y, YE JF, *et al.* The mechanism of donkey-hide gelatin in increasing leukocyte[J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2005, 22(2): 102
- [5] HUANG JL, ZHAO YP, BAI DY, *et al.* Erratum: donkey genome and insight into the imprinting of fast karyotype evolution[J]. Sci Rep, 2015, 5, 14106; doi: 10. 1038/srep14106(2015)
- [6] 秦红丽, 朱明艳. 中国养马业现状[J]. 畜牧兽医科技信息, 2013(10): 4
QIN HL, ZHU MY. Current situation of horse raising industry in China[J]. Chin J Anim Husb Vet Med, 2013(10): 4
- [7] 黄世琼, 张伟, 彭娅. 驴皮的真伪鉴别[J]. 海峡药学, 2016, 28(4): 50
HUANG SQ, ZHANG W, PENG Y. Studies on identification of Furs of Equus Asinus[J]. Strait Pharm J, 2016, 28: 50-53.
- [8] LV P, ZHOU XS, YOU JH, *et al.* Extraction of trace amount of severely degraded DNA[J]. Z Naturforsch, 2009(7-8): 581
- [9] 胡军影, 程显隆, 肖新月, 等. 阿胶的化学成分及质量评价方法研究进展[J]. 中国药事, 2007, 21(3): 193
HU JY, CHENG XL, XIAO XY, *et al.* Review on chemical compositions and quality evaluation of gelatina nigra[J]. Chin Pharm Aff, 2007, 21(3): 193
- [10] KEIL B. Specificity of Proteolysis[M]. Berlin: Springer-Verlag, 1992
- [11] 崔琳, 张贵锋, 刘涛, 等. 液相色谱/质谱联用法分析不同年龄鼠皮肤中 I 型、III 型胶原蛋白相对含量[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(4): 71
CUI L, ZHANG GF, LIU T, *et al.* High performance chromatography/mass spectrometric analysis of the collagen I / III ratio in rat skin at different stages of growth[J]. Chin Biotech, 2007, 27(4): 71
- [12] 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, 2008, 36(11): 1499
ZHANG GF, LIU T, WANG Q, *et al.* Identification of specific peptides in digested gelatins by high performance liquid chromatography/mass spectrometry[J]. Chin J Anal Chem, 2008, 36(11): 1499
- [13] ZHANG GF, LIU T, WANG Q, *et al.* Mass spectrometric detection of marker peptides in tryptic digests of gelatin: a new method to differentiate between bovine and porcine gelatin food[J]. Food Hydrocoll, 2009, 3(7): 2001
- [14] 王前, 张贵锋, 刘涛, 等. 基于串联质谱的鱼皮明胶鉴别研究[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(6): 101
WANG Q, ZHANG GF, LIU T, *et al.* Differentiation of fish gelatin from bovine/porcine gelatin by tandem mass spectrometry[J]. J Chin Biotech, 2009, 29(6): 101
- [15] 程显隆, 李文杰, 魏锋, 等. 动物胶类药材的鉴别方法研究进展[J]. 亚太传统医药, 2011, 7(3): 167
CHENG XL, LI WJ, WEI F, *et al.* Advances in studies on identified method of gelatins[J]. Asia Pac Tradit Med, 2011, 7(3): 167
- [16] 程显隆, 李文杰, 张小龙, 等. UPLC-QTOF-MS 结合主成分分析法用于龟甲胶、鹿角胶中添加牛皮源成分的检测研究[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(6): 931
CHENG XL, LI WJ, ZHANG XL, *et al.* Identification of bovine-hide gelatin from glue of tortoise shell and deer-horn gelatin by UPLC-QTOF-MS and principal component analysis[J]. Chin J Pharm Anal, 2012, 32(6): 931
- [17] CHENG XL, WEI F, CHEN J, *et al.* Using the doubly charged selected ion coupled with MS/MS fragments monitoring (DCSI-MS/MS) mode for the identification of gelatin species[J]. J Anal Methods Chem, 2014, 2014: 49
- [18] CHENG XL, WEI F, XIAO XY, *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

(本文于 2016 年 12 月 12 日收到)