

基于特征肽测定阿胶食品中的5种杂皮源成分

赵艳霞^{1,2}, 巩丽萍^{2*}, 石峰², 杭宝建², 罗学刚^{1*}

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457) (2. 山东省食品药品检验研究院, 山东济南 250101)

摘要: 建立了以特征肽为指标的超高效液相色谱串联质谱测定阿胶食品中马皮等5种杂皮源成分的检测方法。考察了样品提取方式、样品酶解条件, 比较了不同色谱条件对各杂皮源成分的分离效果, 优化了流动相洗脱体系。样品经处理后, 于37℃下经胰蛋白酶酶解, 产生马源寡肽A等杂皮源特征肽段, 以0.1%甲酸水溶液和0.1%甲酸乙腈溶液作为流动相进行梯度洗脱, 流速0.3 mL/min, 柱温40℃, 进样量2 μL, 在电喷雾正离子(ESI⁺)模式下进行多反应监测(MRM), 基质匹配标曲定量。马源寡肽A、鹿皮特征肽在5~500 ng/mL、牛皮特征肽、猪皮特征肽、骆驼皮特征肽在10~500 ng/mL浓度范围内线性关系良好, 相关系数r均大于0.999, 方法定量限为0.082~1.1 mg/kg, 加标回收率为86.8%~103.5%。29批次阿胶糕、阿胶饮品样品检出了马、牛皮源成分。该方法专属性强、灵敏度高、操作简单、定量准确, 适用于阿胶糕等食品中杂皮源成分的检测。

关键词: 阿胶糕; 阿胶饮品; 特征肽; 超高效液相色谱-串联质谱

文章编号: 1673-9078(2022)04-234-240

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.4.0676

Determination of Five Skin Ingredients in Asini Corii Colla Foods Based on Marker Peptide

ZHAO Yanxia^{1,2}, GONG Liping^{2*}, SHI Feng², HANG Baojian², LUO Xuegang^{1*}

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

(2. Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China)

Abstract: To establish the method based on marker peptide for determination of the skin ingredients of horse, ox, pig, camel and deer in asini corii colla foods by HPLC MS/MS. The extraction methods and enzymolysis conditions of the samples were investigated, and the separation effects of different chromatographic conditions on the components of various skin sources were compared. The mobile phase elution system was optimized. The samples were hydrolyzed by trypsin at 37 °C. The separation was performed with the gradient elution using the mobile phase consisting of 0.1% formic acid water solution and 0.1% formic acid acetonitrile solution at a flow rate of 0.3 mL/min. The column temperature was set at 40 °C and a sample size of 2 μL. Marker peptides were determined in the modes of electrospray positive ionization (ESI⁺) and multiple reaction monitoring (MRM) with matrix matching scaling quantification. Horse and deer marker peptide showed good linear relationships within the range of 5~500 ng/mL, others showed good linear relationships within the range of 10~500 ng/mL. The limit of detection was 0.082~1.1 mg/kg. The spike recoveries (n=6) of dimethyl sulfate were 86.8%~103.5%. Marker peptides of horse and ox were detected in 29 samples. The method is specific, sensitive, simple, rapid and accurate, and can be used for the the determination of the skin ingredients of horse, ox, pig, camel and deer in asini corii colla pastry and asini corii colla drinks.

Key words: asini corii colla pastry; asini corii colla drinks; marker peptide; high performance liquid chromatography and quadrupole tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)

引文格式:

赵艳霞, 巩丽萍, 石峰, 等. 基于特征肽测定阿胶食品中的5种杂皮源成分[J]. 现代食品科技, 2022, 38(4): 234-240, +281

ZHAO Yanxia, GONG Liping, SHI feng, et al. Determination of five skin ingredients in asini corii colla foods based on marker peptide [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(4): 234-240, +281

收稿日期: 2021-06-26

基金项目: 国家重大新药创制专项(2014ZX0930437); 山东省重点研发计划(YDZX20173700004448)

作者简介: 赵艳霞(1991-), 女, 主管药师, 研究方向: 食品药品质量分析, E-mail: zhaoyanxias@126.com

通讯作者: 巩丽萍(1979-), 女, 主任药师, 硕士研究生, 研究方向: 药品质量工程, E-mail: gongliping_lp@163.com; 共同通讯作者: 罗学刚(1981-),

男, 博士研究生, 教授, 研究方向: 微生态健康功能机制及益生制品研发, E-mail: luoxuegang@tust.edu.cn

阿胶为我国传统中药^[1], 同时为山东省地方特色产品。阿胶是以马科动物驴的干燥皮或鲜皮经煎煮、浓缩制成的固体胶, 其主要成分为驴皮胶原蛋白。市面上的阿胶食品主要有阿胶糕、阿胶浆、阿胶口服液、阿胶膏等(为方便研究对象分类将液态阿胶食品统称为阿胶饮品)。这些阿胶产品质量参差不齐, 价格也相差甚远。原因在于, 阿胶生产企业皮源材料不同, 部分不法企业采用马、牛、猪等杂皮冒充或是皮革加工过程中割下来废弃的头脸皮和腿脚皮等下脚料投料, 而非整张驴皮投料生产, 并且现有检测标准不能很好地控制和反映产品品质。

阿胶糕是以阿胶、核桃仁、黑芝麻、红枣、枸杞或其他可用于食品的普通食品原料或卫生部批准的允许使用的新食品原料为原料, 添加冰糖、黄酒等辅料, 经原料处理、配料、熬制、冷却、切片、包装等加工工艺制成的含阿胶类食品。阿胶饮品是以阿胶、水为主要原料, 添加或不添加大枣、枸杞、人参等中药材, 采用现代提取、分离、精制技术研制而成的产品, 主要包括阿胶浆、阿胶口服液、阿胶膏等。作为阿胶的衍生品, 阿胶糕及阿胶饮品极具山东地方特色。

目前动物皮源成分的检测方法主要有荧光定量PCR法、液质联用法等^[2-9], 这些方法大多用于动物皮及原料阿胶的检测。针对阿胶糕及阿胶饮品中马皮等杂皮源成分的检测方法, 目前尚无相关国家、地方标准发布。

本研究通过获取动物皮源特征肽段的分子量信息采用超高效液相色谱-串联质谱法实现蛋白质种类的鉴别, 方法简便、快速、准确、灵敏, 可有效控制阿胶食品的掺假现象, 提升产品品质。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 主要仪器设备

AB SCIEX Triple Quad 6500+超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪, 美国 AB 公司; CP225D 电子天平, 美国赛得利斯公司; 涡旋振荡器, 大龙兴创实验仪器有限公司; KQ-300GDV 型恒温超声仪, 昆山市超声仪器有限公司; 超纯水仪, 美国 Millipore 公司。

1.1.2 主要耗材和试剂

乙腈(色谱纯), 美国 Fisher 公司; 甲酸(质谱级), 美国 ACS 恩科化学公司; 丙酮(分析纯), 国药集团; 三氯乙酸(分析纯), 天津市科密欧化学试剂公司; 胰蛋白酶(序列分析纯), Sigma 公司; 碳酸氢铵(分析纯), 国药集团; 去离子水。

标准物质: 阿胶对照药材、马源寡肽 A ($C_{31}H_{54}N_{12}O_{11}$), 购于中国食品药品检定研究院, 纯度 $\geq 90.0\%$; 牛源特征肽 ($C_{34}H_{55}N_{13}O_{13}$)、猪源特征肽 ($C_{34}H_{58}N_{12}O_{11}$)、骆驼源特征肽 ($C_{61}H_{93}N_{17}O_{25}$)、鹿源特征肽 ($C_{61}H_{93}N_{17}O_{25}$), 由上海强耀生物有限公司合成, 纯度 $\geq 90.0\%$ 。

样品: 不同厂家阿胶糕样品共 19 批次, 不同厂家阿胶饮品(包括阿胶浆、阿胶口服液、阿胶膏)共 10 批次。

1.2 仪器主要工作条件

色谱参数: 色谱柱为 Waters BEH C18 色谱柱 (2.1 mm \times 100 mm, 2.5 μ m), 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B 为 0.1% 甲酸乙腈溶液, 梯度洗脱程序: 0~1.5 min, 5% B; 1.5~6 min, 5% B~50% B; 6~6.1 min, 50% B~70% B; 6.1~8 min, 70% B; 8~8.1 min, 70% B~5% B; 8.1~12 min, 5% B。流速 0.3 mL/min, 柱温 40 $^{\circ}$ C, 进样量 2 μ L。

质谱参数: 离子源: 电喷雾离子源 (ESI); 扫描模式: 正离子扫描; 多反应监测; 涡旋离子喷雾温度: 550 $^{\circ}$ C; 离子化电压: 5500 V; 气帘气: 35; 雾化气: 50; 辅助加热气: 55; 入口电压: 10 V; 碰撞室出口电压: 19 V; 碰撞气: 9; 其他质谱参数见表 1。

表 1 各特征肽的质谱采集离子信息

Table 1 Ion information of five marker peptides acquired by

特征肽	mass spectrometry			
	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔 电压/V	碰撞 电压/eV
马源寡肽 A	386.4	377.3*	50	16
		322.3	50	15
牛源特征肽	427.9	668.4*	50	10
		329.2	50	10
猪源特征肽	406.5	657.3*	45	23
		556.3	45	24
骆驼源特征肽	611.5	940.4*	40	19
		282.2	40	16
鹿源特征肽	733.0	875.6*	47	38
		962.6	47	37

注: *为定量离子。

1.3 溶液配制

稀释液: 取碳酸氢铵适量, 加水溶解并稀释制成 10 mg/mL 的溶液, 密闭保存。

胰蛋白酶溶液: 取胰蛋白酶适量, 加稀释液溶解并稀释制成 1 mg/mL 的溶液, 临用现配。

各杂皮特征肽标准储备液：准确称取马源寡肽 A、牛源特征肽、猪源特征肽、骆驼源特征肽、鹿源特征肽对照品适量，精密称定，加稀释液溶解并稀释制成 1 mg/mL 的溶液。

阿胶基质溶液：取阿胶对照药材粉末适量，精密称定，加稀释液溶解并稀释制成 0.2 mg/mL 的溶液。

各杂皮特征肽中间工作溶液：精密量取各杂皮特征肽标准储备液适量，加阿胶基质溶液稀释制成 4.0 μ g/mL 的溶液。

标准曲线工作溶液：精密量取中间工作溶液适量，加阿胶基质溶液稀释，制成系列浓度的标准曲线工作溶液。马源寡肽 A、鹿皮特征肽的浓度为 5、10、50、100、200、500 ng/mL，牛皮特征肽、猪皮特征肽、骆驼皮特征肽的浓度为 10、20、50、100、200、500 ng/mL。

酶解：精密量取各系列浓度的标准曲线工作溶液 1.00 mL，分别加胰蛋白酶溶液 100 μ L，摇匀，37 $^{\circ}$ C 恒温酶解 16 h，取出，冷却至室温，经 0.22 μ m 滤膜过滤，用于 LC-MS/MS 定量测定。

1.4 样品前处理

阿胶糕：取试样约 50 g，冷冻放置过夜，取出，置于粉碎机中粉碎。称取粉碎好的试样 1.0 g，置于 50 mL 塑料离心管中，精密加入稀释液 50 mL，超声处理 30 min，以 8000 r/min 离心 10 min，精密量取上清液 1 mL，加稀释液稀释至 10 mL，摇匀，经 0.22 μ m 滤膜过滤。

阿胶饮品：取试样不少于 100 mL (g)，混匀。称取混匀后的试样 2.0 g，精密称定，置于 15 mL 塑料离心管中，精密加入稀释液 10 mL，摇匀。精密量取 1 mL，加稀释液稀释至 5.00 mL，摇匀，经 0.22 μ m 滤膜过滤。

酶解：取上述滤液按照标准曲线工作溶液酶解步骤进行酶解，用于 LC-MS/MS 定量测定。

1.5 数据处理

标准曲线工作溶液和样品溶液通过液质联用仪进行测试，以各特征肽峰面积为纵坐标，以浓度为横坐标对标准工作溶液绘制标准工作曲线，并计算样品溶液中各杂皮源成分含量。

2 结果与讨论

2.1 专属性

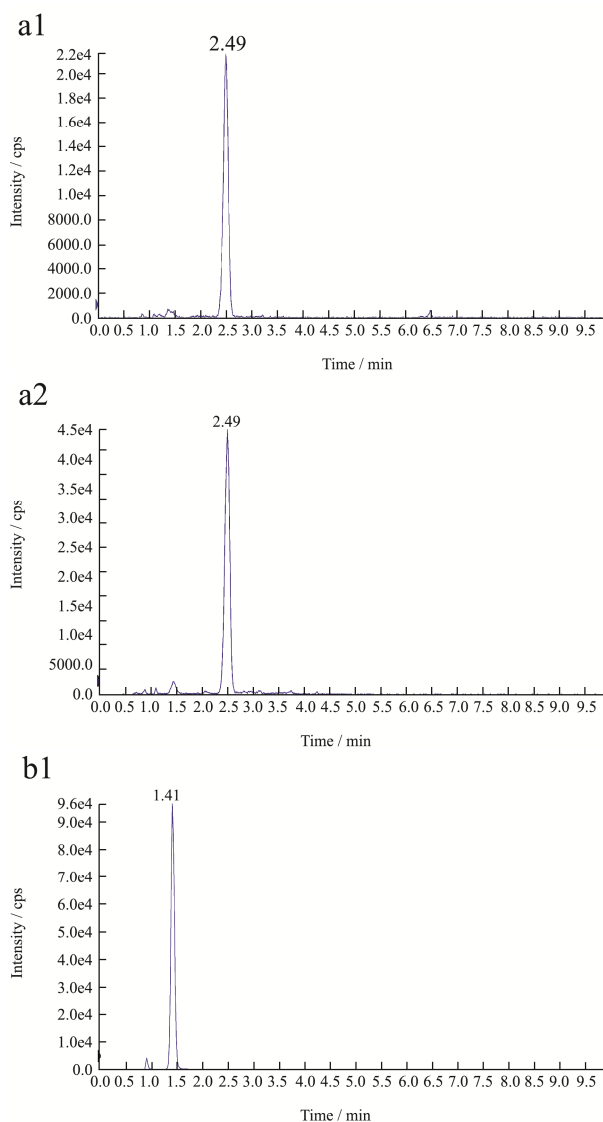
2.1.1 特征肽的发现

阿胶主要成分为驴皮胶原蛋白，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%。

通过将驴与马、牛、猪、骆驼、鹿的 I 型胶原蛋白序列进行 blast 多序列比对，找到不同物种胶原蛋白之间的差异序列，进一步采用胰蛋白酶酶切胶原蛋白获得物种相对的理论特征肽段，再通过高分质谱对各特征肽进行验证，对碎片进行归属，找到各物种的特异性肽段^[7]。

2.1.2 专属性实验

以马、牛、猪、骆驼、鹿皮模拟阿胶生产工艺分别熬制成获得各物种的杂皮胶。以各杂皮胶样品为阳性样品，阿胶基质溶液配制样品溶液，按 1.4 项下进行样品制备，选择马、牛、猪、骆驼、鹿皮特征肽检测离子对进行测定。在马、牛、猪、骆驼、鹿皮胶各色谱图中特征肽相应的保留时间位置上，均无其他物种的特征肽检出，阿胶基质溶液经酶解处理后进样的色谱图中，各特征肽相应的的保留时间位置上均无各特征肽的的色谱峰，说明各杂皮胶的特征肽段具有物种特异性，专属性强，对测定结果无干扰，见图 1。



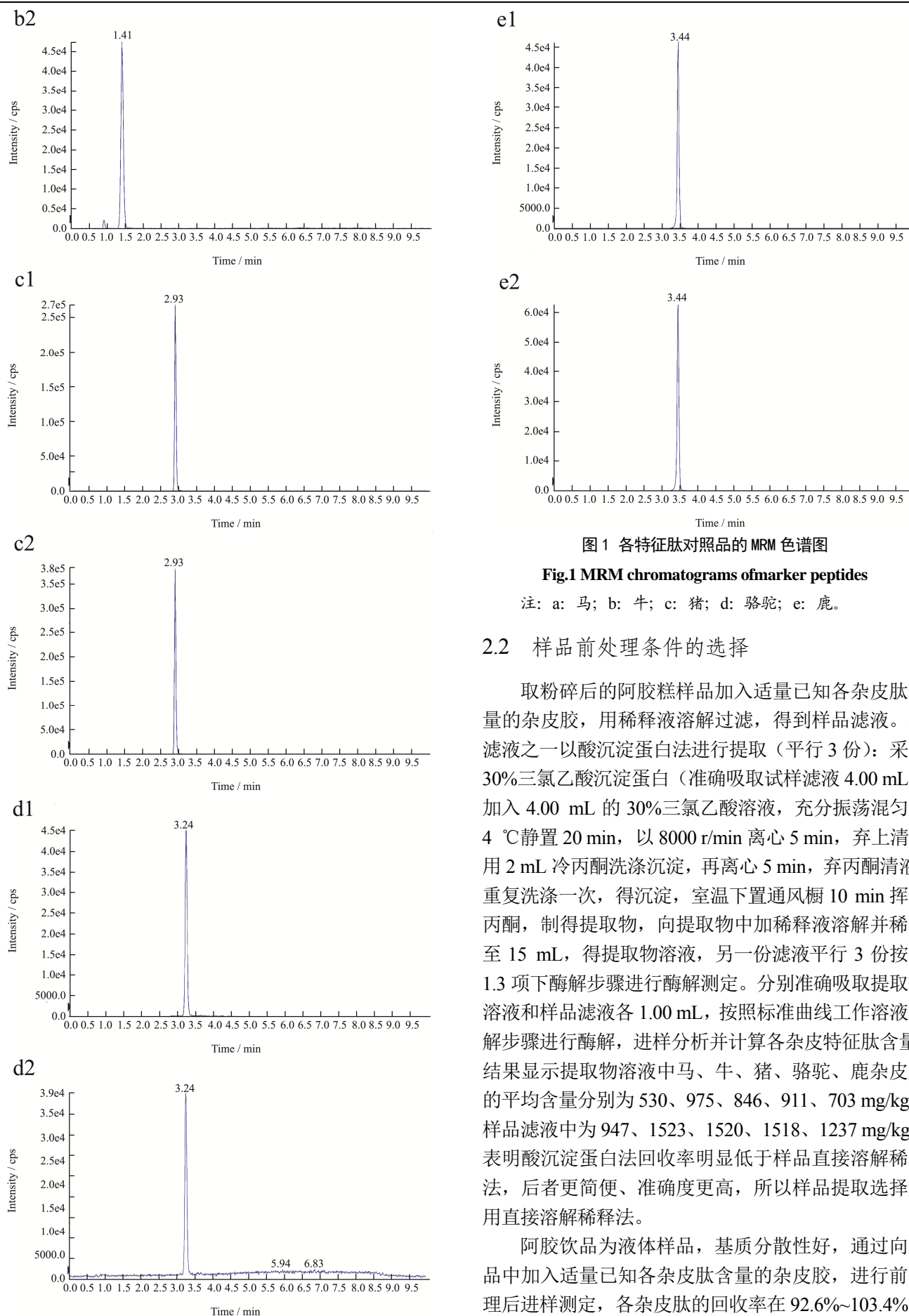


图1 各特征肽对照品的MRM色谱图

Fig.1 MRM chromatograms of marker peptides

注: a: 马; b: 牛; c: 猪; d: 骆驼; e: 鹿。

2.2 样品前处理条件的选择

取粉碎后的阿胶糕样品加入适量已知各杂肽含量的杂皮胶,用稀释液溶解过滤,得到样品滤液。取滤液之一以酸沉淀蛋白法进行提取(平行3份):采用30%三氯乙酸沉淀蛋白(准确吸取试样滤液4.00 mL,加入4.00 mL的30%三氯乙酸溶液,充分振荡混匀,4℃静置20 min,以8000 r/min离心5 min,弃上清,用2 mL冷丙酮洗涤沉淀,再离心5 min,弃丙酮清液;重复洗涤一次,得沉淀,室温下置通风橱10 min挥干丙酮,制得提取物,向提取物中加稀释液溶解并稀释至15 mL,得提取物溶液,另一份滤液平行3份按照1.3项下酶解步骤进行酶解测定。分别准确吸取提取物溶液和样品滤液各1.00 mL,按照标准曲线工作溶液酶解步骤进行酶解,进样分析并计算各杂皮特征肽含量,结果显示提取物溶液中马、牛、猪、骆驼、鹿杂肽的平均含量分别为530、975、846、911、703 mg/kg,样品滤液中为947、1523、1520、1518、1237 mg/kg,表明酸沉淀蛋白法回收率明显低于样品直接溶解稀释法,后者更简便、准确度更高,所以样品提取选择采用直接溶解稀释法。

阿胶饮品为液体样品,基质分散性好,通过向样品中加入适量已知各杂肽含量的杂皮胶,进行前处理后进样测定,各杂肽的回收率在92.6%~103.4%,

表明直接稀释提取可用于阿胶饮品的测定。

2.3 色谱条件的考察

本实验比较了不同色谱柱 XBridge BEH C18 (100 mm×2.1 mm, 2.5 μm)、BEH C18 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm)、BEH Shiled RP C18 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 0.1%甲酸乙腈-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液两种流动相体系对目标化合物进行分离的情况。结果表明不同色谱柱上各杂肽的保留时间不同, 通过调节流动相的比例, 均可实现与基质中干扰组分的有效分离。样品溶液经酶解后有一定的基质, 填料粒径越小的色谱柱压力越大, 随着样品测定次数增多, 压力会持续增加, 影响色谱柱的寿命, 同时也会对仪器产生影响, 因此推荐使用填料粒径相对大的 XBridge BEH C18 为分析色谱柱。前流动相相比后流动相得到的各杂肽的离子信号强度更高, 多次进样的保留时间 RSD 值更小, 保留行为更稳定, 分析原因为有机相中酸的加入可使氢离子的浓度在梯度洗脱过程中保持稳定, 提高了被分析化合物的离子化效率和稳定性。

2.4 质谱条件的考察

将各杂肽标准溶液 (4.0 μg/mL) 通过蠕动泵 (流速 10 μL/min) 进样, 通过一级全扫描找到母离子, 再通过二级全扫描找到二级碎片离子, 不断改变碰撞能使碎片离子响应增强, 通过优化获得最佳离子源参数, 确定碎裂电压及碰撞能量。按照《质谱分析方法通则》(GB/T 6041-2020) 的要求, 选择两队特征子离子对目标化合物进行定性定量分析, 以信噪比高、峰形好、干扰小的离子对作为定量离子对进行定量, 以另一对离子对作为定性离子对, 并同时应用两队离子对进行丰度比计算以定性分析。

2.5 胰蛋白酶酶解条件的考察

胰蛋白酶是胶原蛋白最常用水解酶, 是一种肽链内切酶, 只断裂赖氨酸或精氨酸的羧基参与形成的肽

键, 是特异性最强的蛋白酶, 可特异性水解阿胶中的胶原蛋白。胶原蛋白水解后会得到大量多肽, 通过比对筛选出可以用作定性定量分析的特征肽。为获得高的酶解效率, 以本实验室熬制的马皮胶、牛皮胶、猪皮胶、骆驼皮胶、鹿皮胶作为样品, 按照 1.3 项阿胶基质溶液制备杂皮胶溶液, 再按照 1.4 项下酶解过程进行酶解, 固定酶解温度 (胰蛋白酶最适温度 37 °C) 和酶解时间^[7], 以各杂肽的定量离子对峰面积考察不同浓度酶 (0.25、0.5、1、2、4、5 mg/mL, 各加 100 μL) 对测定结果的影响, 结果见图 2。

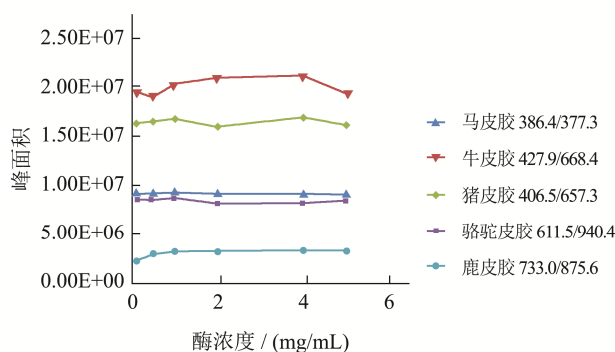


图 2 各杂皮胶在不同酶用量下的酶解结果

Fig.2 The results of samples at different enzyme dosages

由图 2 可以看出, 随着酶浓度的逐渐增加, 酶解效率也升高, 逐渐达到平稳。根据酶解效果确定试样溶液加浓度为 1 mg/mL 的胰蛋白酶溶液 100 μL。

2.6 方法的线性关系及定量限

取杂皮特征肽系列标准溶液进样, 以各特征肽峰面积 Y 为纵坐标, 各特征肽对照品浓度 (ng/mL) 为横坐标, 绘制标准曲线, 结果表明马源寡肽 A、鹿皮特征肽在 5~500 ng/mL、牛皮特征肽、猪皮特征肽、骆驼皮特征肽在 10~500 ng/mL 浓度范围内相关系数 r 均大于 0.999, 各杂皮特征肽线性关系良好。将各杂皮特征肽标准溶液逐级稀释, 以 10 倍信噪比对应的溶液浓度折合计算到阿胶糕、阿胶饮品中的定量限, 结果见表 2。

表 2 各特征肽的线性范围、线性方程、相关系数及定量限

Table 2 Linearity ranges, regression equations, correlation coefficients (r) and LOQs for the marker peptides

特征肽	线性范围/(ng/mL)	线性方程	相关系数 r	定量限/(mg/kg)	
				阿胶糕	阿胶浆
马源寡肽 A	10~500	Y=123.87X+189.11	0.9995	0.82	0.082
牛源特征肽	5~500	Y=78.26X-95.50	0.9996	1.1	0.11
猪源特征肽	5~500	Y=5.24X+15.23	0.9999	1.1	0.11
骆驼源特征肽	5~500	Y=487.43X+712.45	0.9991	1.1	0.11
鹿源特征肽	10~500	Y=22.96X+61.52	0.9999	0.82	0.082

2.7 空白基质的选择

本研究实际样品有阿胶糕、阿胶浆、阿胶口服液、阿胶膏等，样品组成有一定差异，因此对不同的空白基质进行了考察。

阿胶糕空白基质溶液：称取粉碎好的阴性阿胶糕试样 1.0 g 置于 50 mL 塑料离心管中，精密加入稀释液 50 mL，超声处理 30 min，以 8000 r/min 离心 10 min，精密量取上清液稀释 10 倍后作为阿胶糕空白基质溶液。

阿胶饮品空白基质：分别称取阿胶浆、阿胶膏混匀后的试样 2.0 g，精密称定，分别置于 15 mL 塑料离心管中，精密加入稀释液 10 mL，摇匀，精密量取上清液稀释 5 倍后分别作为阿胶饮品空白基质溶液。

按照 1.3 项下分别配制阿胶糕、阿胶浆、阿胶膏空白基质标曲，与阿胶基质配制标曲测定同一加标后的阿胶糕、阿胶浆、阿胶膏样品，不同空白基质测定的样品结果的相对标准偏差在 1.96%~5.78%，差异较小。为操作方便，测定样品时统一选择了阿胶对照药材作为空白基质。

2.8 定量方式与基质效应评价

采用液质联用对复杂基质样品进行分析，复杂基质会对测定结果产生一定影响。因此，在建立方法时需对基质效应 (ME) 进行评价^[10-12]。本方法测定的目标物为阿胶通过胰蛋白酶酶解产生的各杂皮源特征

肽，故以阿胶对照药材为基质评估基质效应。分别用稀释液和阿胶基质溶液按 1.3 项下分别配制标准曲线，将以阿胶基质溶液配制的标准曲线溶液进行酶解处理，分别进样测定，评估基质效应，结果显示马、牛、猪、骆驼、鹿杂皮特征肽的绝对基质效应分别为 21.0%、25.6%、22.3%、23.7%、21.9%，均大于 20.0%，说明有一定的基质效应，因此本方法采用基质匹配的标准曲线进行测定，确保定量结果的准确性。

2.9 各特征肽溶液的稳定性

考察了各杂皮特征肽标准溶液 (浓度为 100 ng/mL) 的稳定性。分别考察了液相进样室温度 15 °C 下，放置时间为 0、2、4、6、8、12 h 时，目标肽段的峰面积变化情况，各杂皮特征肽峰面积的 RSD 值均小于 5.0%，说明各杂皮特征肽稳定性好。

2.10 回收率和精密度

对马皮胶、牛皮胶、猪皮胶、骆驼皮胶、鹿皮胶按照 1.3 项阿胶基质溶液制备杂皮胶溶液，再按照酶解过程酶解后进样测定，得到各杂皮胶中特征肽的准确含量。通过向阿胶糕、阿胶饮品样品中添加 5%、10%、50% 三个浓度水平的杂皮胶，平行测定 6 次，每个水平平均回收率与相对标准偏差结果见表 3。各杂皮胶的平均加标回收率在 86.8%~103.5%，RSD 值均小于 10%，能够满足实际样品检测需求。

表 3 加标回收率与相对标准偏差结果 (n=6)

Table 3 Recoveries and RSD of five marker peptides (n=6)

特征肽	添加量/(ng/g)	阿胶糕			阿胶浆		
		测得量/(ng/g)	回收率/%	RSD/%	测得量/(ng/g)	回收率/%	RSD/%
马源寡肽 A	3.36	3.10	92.4	2.84	3.26	96.8	1.88
	6.72	6.56	97.6	1.49	6.62	98.4	2.04
	33.60	34.04	101.3	2.56	33.00	98.2	1.95
牛源特征肽	2.52	2.61	103.5	2.37	2.52	100.1	4.10
	5.04	5.08	100.8	0.35	4.81	95.4	4.16
	25.20	25.48	101.1	1.09	24.34	96.6	2.86
猪源特征肽	2.52	2.56	101.4	1.65	2.48	98.5	1.89
	5.04	4.85	96.2	2.40	5.18	102.7	2.62
	25.20	24.07	95.5	0.72	26.06	103.4	2.04
骆驼源特征肽	2.52	2.19	86.8	3.76	2.23	88.6	5.81
	5.04	4.93	97.8	1.96	4.65	92.3	2.46
	25.20	22.18	88.0	4.56	23.84	94.6	5.55
鹿源特征肽	3.36	3.32	98.7	3.42	3.33	99.1	3.56
	6.72	6.48	96.4	1.69	6.80	101.3	2.79
	33.60	34.40	102.4	2.35	34.48	102.6	3.31

2.11 实际样品测定

采用本方法对来源于生产企业以及市场销售的 19 批阿胶糕样品、10 批阿胶饮品（包括阿胶浆、阿胶口服液、阿胶膏）样品按 1.4 项下制备供试品溶液，注入液质联用仪进行测定，4 批阿胶糕、2 批阿胶浆样品检出马源性成分，含量为 15.5~68.3 mg/kg；4 批阿胶糕、1 批阿胶膏样品检出牛源性成分，含量为 6.5~91.3 mg/kg。

3 结论

本文建立了基于特征肽的超高效液相色谱-串联质谱测定阿胶糕及阿胶饮品中马皮等杂皮源成分含量的检测方法，考察了样品前处理方式，比较了酶的用量，进行了基质效应评估，采用基质匹配的标准曲线定量，方法准确度高。样品测定结果表明生产企业存在一定的掺假行为，因此非常有必要对阿胶产品进行杂皮源成分的检测。本方法操作简便，结果可靠，重现性好，可用于阿胶糕及阿胶饮品中马皮等杂皮源成分的测定，提升产品质量，同时可为产品监管提供技术支持。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 197-198
National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Part 1) [M]. Beijing: The Medicine Science and Technology Press of China, 2020: 197-198
- [2] 许长华, 周群, 孙素琴. 二维相关红外光谱法与阿胶的真伪鉴别[J]. 分析化学, 2005, 33(2): 221-224
XU Changhua, ZHOU Qun, SUN Suqin. The identification of ejiao by two dimensional correlation infrared spectroscopy [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2005, 33(2): 221-224
- [3] 张贵锋, 刘涛, 王前, 等. 中药阿胶的质量控制方法研究[J]. 药物生物技术, 2009, 16(3): 250-254
ZHANG Guifeng, LIU Tao, WANG Qian, et al. Investigation on quality control of ejiao by mass spectrometry [J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2009, 16(3): 250-254
- [4] 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, 6: 931-935
CHENG Xianlong, LI Wenjie, ZHANG Xiaolong, et al. Identification of bovine-hide gelatin from glue of tortoiseshell and deer-horn gelatin by UPLC-QTOF-MS and principal component analysis [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2012, 32(6): 931-935
- [5] 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
LONG Guoyou, LI Minghua, LIU Wei, et al. RRLC/QQQ-MS analysis of donkey-hide gelatin in ejiao buxue granula [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2016, 36(5): 826-829
- [6] 程显隆, 陈佳, 李明华, 等. 特征肽段检测技术用于胶类药材专属性鉴别方法研究[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(2): 104-108
CHENG Xianlong, CHEN Jia, LI Minghua, et al. Identification study of glue medicines [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2015, 50(2): 104-108
- [7] LI Xue, SHI Feng, GONG Liping, et al. Species-specific identification of collagen components in colla corii asini using a nano-liquid chromatography tandem mass spectrometry proteomics approach [J]. International Journal of Nanomedicine, 2017, 12: 4443-4454
- [8] CHENG Xianlong, WEI Feng, CHEN Jia, 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]. Journal of Analytical Methods in Chemistry, 2014: 49-55
- [9] 程显隆. 胶类药材质量控制关键技术研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2012
CHENG Xianlong. Studies on the technique of quality control of gelatin drug [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2012
- [10] 张续, 邱天, 付慧, 等. 超高效液相色谱-三重四极杆质谱法测定人尿中 9 种邻苯二甲酸酯代谢物[J]. 色谱, 2018, 36(9): 895-903
ZHANG Xu, QIU Tian, FU Hui, et al. Determination of nine phthalate ester metabolites in human urine using ultra high performance liquid chromatography tandem triple quadrupole mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2018, 36(9): 895-903
- [11] 林潇, 邱天, 张续, 等. 高通量固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定人尿中 8 种环境酚类内分泌干扰物[J]. 色谱, 2020, 38(12): 1456-1464
LIN Xiao, QIU Tian, ZHANG Xu, et al. Determination of eight environmental phenols in human urine samples by high-throughput solid-phase extraction-ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2020, 38(12): 1456-1464