

# 采用安捷伦液质联用技术对 胶类药材进行鉴定

## 应用简报

制药行业

### 作者

胡楠 左帅 杜伟 薄涛  
安捷伦科技（中国）有限公司

### 摘要

本文基于 2015 年版《中国药典》<sup>[1]</sup> 中采用液质联用技术分析胶类药材的定性方法，开发了稳定、快速、灵敏的三重四极杆液质联用 (LC/QQQ) 法和四极杆飞行时间液质联用 (LC/Q-TOF) 法进行阿胶、鹿角胶、龟甲胶的定性鉴别；同时，利用 Q-TOF 强大的化合物定性能力，结合蛋白质库，建立了特征肽段序列分析方法以及“假药”的初步定性方法。

### 前言

胶类药材是我国传统中药中一类特殊的动物药，是由动物的皮、骨骼等特殊工艺加工而成，常见的有阿胶、鹿角胶、龟甲胶及其相关中成药制剂。近年来，随着胶类药用量增长，原料资源供不应求，新闻曝光了一些不法生产企业为降低成本，采用其它动物杂皮投料，给消费者的健康带来严重隐患。为了保障公众用药安全有效，2015 年版《中国药典》<sup>[1]</sup> 制订了符合胶类药材特点的定性方法：采用液质联用技术，分析阿胶、鹿角胶、龟甲胶的特征肽段，方法专属性强、科学可靠。

安捷伦科技公司针对这一变化开发了稳定、快速、灵敏的三重四极杆液质联用 (LC/QQQ) 法，进行阿胶、鹿角胶、龟甲胶的定性鉴别。同时，鉴于很多实验室有高分辨质谱测试需求，我们在药典 LC-QQQ 方法的基础上，开发了四极杆飞行时间液质联用 (LC/Q-TOF) 法。此外，利用 Q-TOF 强大的化合物定性能力，结合蛋白质库，建立了特征肽段序列分析方法以及“假药”的初步定性方法。



Agilent Technologies

## 实验部分

### 试剂和样品材料

实验用色谱纯乙腈购自 Merck，色谱纯甲酸购自 Dikma，超纯水为 Milli-Q 系统制备，碳酸氢铵购自 ACROS，胰蛋白酶购自 Promega。样品材料为市售阿胶、鹿角胶、龟甲胶。

### 仪器

Agilent 1290 Infinity II 超高效液相色谱

Agilent 6460C 三重四极杆质谱仪

Agilent 6530 四极杆飞行时间质谱仪

### 样品制备

取样品粉末 0.01 g，加 1% 碳酸氢铵溶液 5 mL，超声处理 30 分钟后，用 0.22 μM 微孔滤膜过滤，取续滤液 100 μL 置微量进样瓶中，加胰蛋白酶溶液 10 μL（采用序列分析用胰蛋白酶，加 1% 碳酸氢铵溶液制成每 1 mL 中含 1 mg 胰蛋白酶的溶液，临用时配制），摇匀，37 °C 恒温酶解 12 小时。

### 色谱条件

色谱柱: Eclipse Plus C18 (2.1 x 100 mm, 1.8 μm)  
柱温: 40 °C  
进样体积: 5 μL  
流速: 0.3 mL/min  
流动相: A: H<sub>2</sub>O 含 0.1% 甲酸; B: 乙腈  
梯度洗脱: 0 min 5%B; 25 min 20%B; 40 min 50%B

### 三重四极杆串联质谱条件

质谱系统: Agilent 6460C  
离子源: 配备安捷伦喷射流的 ESI  
模式: 正离子  
雾化气: N<sub>2</sub>  
雾化气压力: 30.0 psi  
干燥气温度: 325 °C  
干燥气流量: 8.0 L/min  
毛细管电压: 3500 V  
鞘气温度: 350 °C  
鞘气流量: 12.0 L/min  
喷嘴电压: 0 V  
Delta EMV: 0 V  
扫描模式: MRM

表 1 中列出了与待测物相关的 MS MRM 参数

表 1. 三重四极杆串联质谱 MRM 参数

化合物名	母离子	MS1 分辨率	子离子	MS2 分辨率	驻留时间	碎裂电压 (V)	碰撞能量 (eV)
阿胶	539.8	Unit	612.4	Unit	100	120	20
阿胶	539.8	Unit	923.8	Unit	100	120	20
鹿角胶	765.4	Unit	733.0	Unit	100	135	15
鹿角胶	765.4	Unit	554.0	Unit	100	135	20
龟甲胶	631.3	Unit	921.4	Unit	100	120	30
龟甲胶	631.3	Unit	546.4	Unit	100	120	18

## 四极杆飞行时间质谱条件

质谱系统:	Agilent 6530
离子源:	配备安捷伦喷射流的 ESI
模式:	正离子
雾化气:	N <sub>2</sub>
雾化气压力:	30.0 psi
干燥气温度:	325 °C
干燥气流量:	8.0 L/min
毛细管电压:	3500 V
鞘气温度:	350 °C
鞘气流量:	12.0 L/min
喷嘴电压:	0 V
扫描速度:	3 谱图/秒
扫描模式:	鉴定采用 Target MS/MS, 未知肽段定性采用 Auto MS/MS

表 2. 四极杆飞行时间质谱目标质量数列表

化合物名	质量	价态	窗口宽度	碰撞能量 (eV)
阿胶	539.7862	2	Medium	20
鹿角胶	765.7108	2	Medium	15
鹿角胶	765.7108	2	Medium	20
龟甲胶	631.3355	2	Medium	30
龟甲胶	631.3355	2	Medium	18

表 2 中列出了与待测物相关的目标质量数

## 结果与讨论

基于 2015 年版《中国药典》开发的 LC/QQQ 法分析胶类药材, 重现性好、灵敏度高。阿胶、鹿角胶、龟甲胶各 MRM 通道信噪比均大于 500, 其中龟甲胶的 631.3→546.4 通道信噪比大于 77000 (如图 1 所示), 完全能够满足 2015 年版《中国药典》信噪比大于 3:1 的要求。

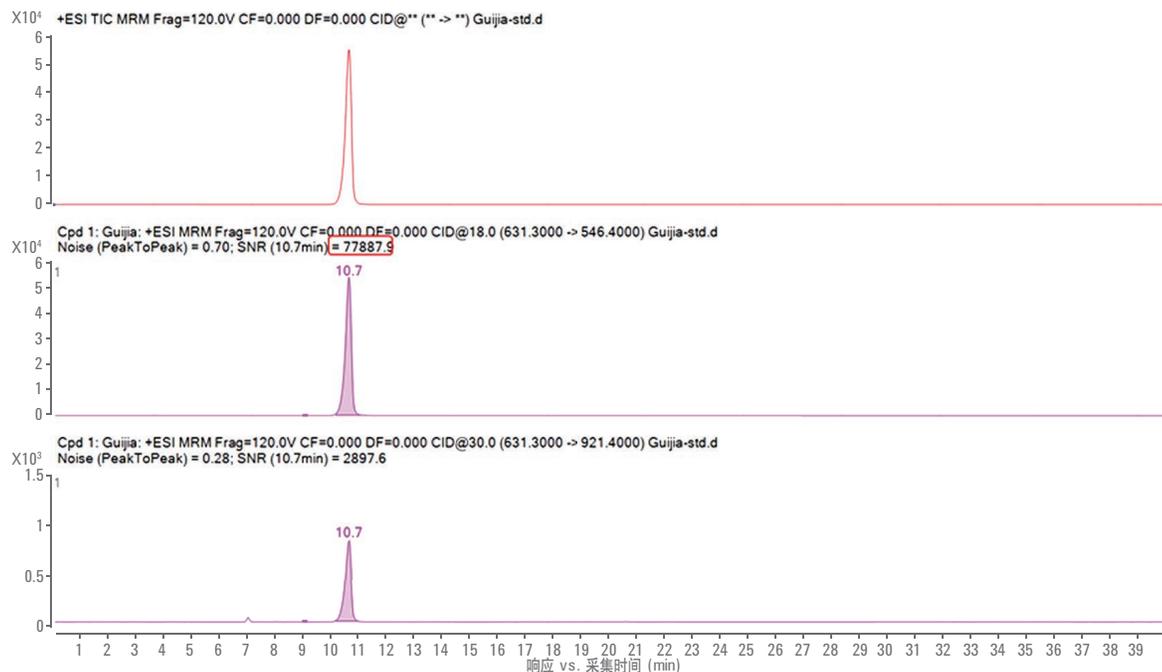


图 1. 采用 LC/QQQ 法分析龟甲胶所得 TIC 及 MRM 色谱图, 其中 631.3→546.4 通道信噪比大于 77000, 从上到下依次为: TIC 色谱图, 通道 631.3→546.4 和 631.3→921.4 的 MRM 色谱图

采用 LC/Q-TOF 法分析胶类药物时，利用 Target MS/MS 模式采集数据，运用高分辨 EIC 碎片离子提取技术进行数据处理，可以获得与 LC/QQQ 法一致的定性结果。阿胶、鹿角胶、龟甲胶各特征离子信噪比均大于 200，同样完全满足 2015 年版《中国药典》信噪比大于 3:1 的要求。图 2 为采用 LC/Q-TOF 法分析龟甲胶所得特征碎片离子色谱图。

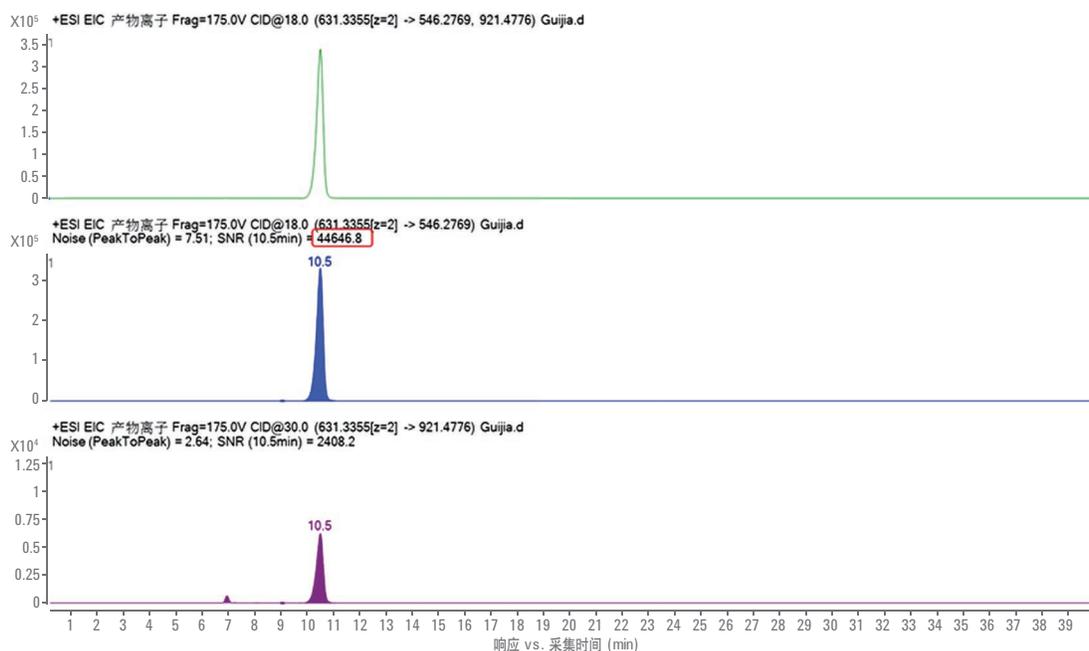


图 2. 采用 LC/Q-TOF 法分析龟甲胶所得高分辨特征碎片离子色谱图，其中 631.3→546.4 通道信噪比大于 44000，从上到下依次为：两个特征离子提取色谱图，通道 631.3355→546.2769 和 631.3355→921.4776 的提取离子流图，提取离子窗口宽度 50 ppm

除了药典规定的离子对外，还可结合文献报道<sup>[2,3]</sup>的特征肽段，采用 QQQ SIM 模式或 Q-TOF 提取离子模式进行胶类样品的专属性鉴别，杜绝掺假样品。图 3 为阿胶特征谱图。

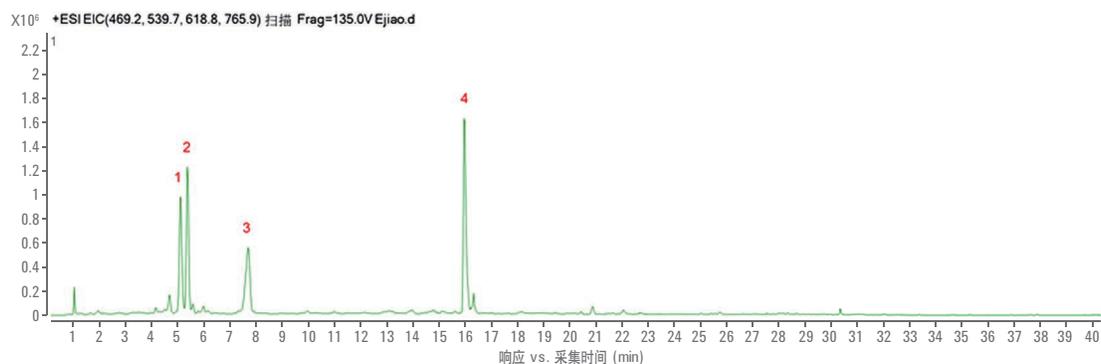


图 3. 阿胶特征谱图：1. m/z 469.2；2. m/z 618.8；3. m/z 539.8；4. m/z 765.9

此外，Q-TOF 可以提供可靠的 MS 和 MS/MS 数据，其具有强大的化合物定性能力，结合蛋白质库，可以进行特征肽段的序列分析。图 4 和图 5 展示了阿胶中上述特征肽段  $m/z$  618.3 二级质谱图及其序列分析结果。该特征肽段位于驴的 I 型胶原蛋白  $\alpha 2$  链上第 692 – 706 位置上，氨基酸序列为 G-E-A-G-A-A-G-P-A-G-P-A-G-P-R。

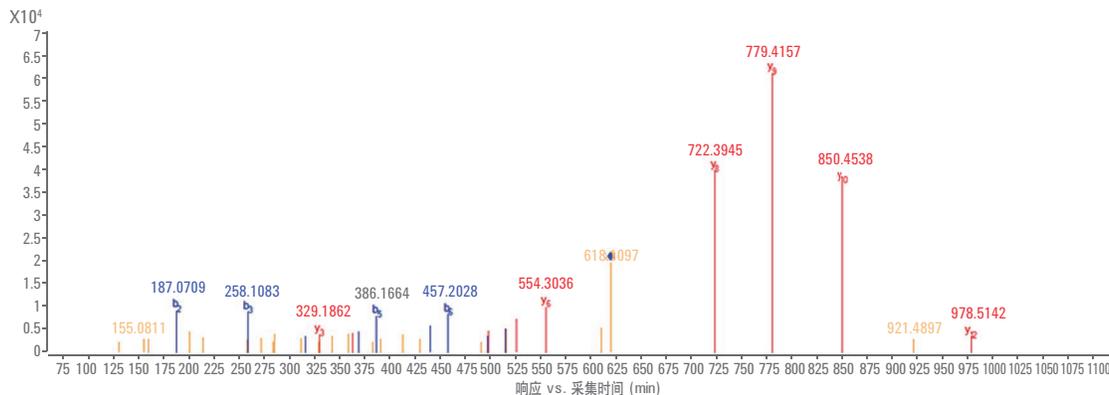


图 4. 阿胶中特征肽段  $m/z$  618.3 的二级质谱图

Abund	Diff (Bio. ppm)	m/z (exp)	m/z (prod)	Ion	Sequence	Z (prod)
9265.3	-2.4	187.07	187.0713	b2	GE	1
8932.9	-0.5	258.10	258.1084	b3	GEA	1
3612.2	1.4	315.13	315.1299	b4	GEAG	1
8007.7	-1.6	386.16	386.167	b5	GEAGA	1
8494.9	-3	457.20	457.2041	b6	GEAGAA	1
5347.1	-1.4	514.22	514.2256	b7	GEAGAAAG	1
3978.1	-21.2	329.18	329.1932	y3	GPPI	1
4863.7	-5.4	497.28	497.2831	y5	PAGPRI	1
10165.6	-1.7	554.30	554.3045	y6	GPAGPRI	1
39795.8	0.2	722.39	722.3944	y8	PAGPAGPRI	1
4478.8	0.6	361.701	361.7008	y8	PAGPAGPRI	2
61054.9	-0.2	779.41	779.4159	y9	GPAGPAGPRI	1
37324.7	1	850.45	850.453	y10	AGPAGPAG...	1
3569.5	2.7	978.51	978.5116	y12	GAAGPAGP...	1
7422.7	0.3	525.27	525.278	y13	AGAAGPAG...	2
4671.1	0.1	368.15	368.1555	b5-H2	GEAGA	1
5956.6	-2.9	439.19	439.1936	b6-H2	GEAGAA	1
3621.6	5.2	496.21	496.215	b7-H2	GEAGAAAG	1

图 5. 阿胶中特征肽段  $m/z$  618.3 的序列分析结果

此种高分辨二级质谱结合蛋白质库的 Q-TOF 分析方法也可扩展到“假胶类药材”分析上。检测时发现一市售龟甲胶未检测出特征离子（图 6），于是对其进行 Auto MS/MS 模式分析，经蛋白质库检索发现多段属于牛皮胶原蛋白的特异性肽段（图 7），推测这份龟甲胶可能是用牛皮或相关产品仿冒的。通过此方法可有效的对“假胶类药材”进行初步定性分析，为打假工作提供了有效依据。

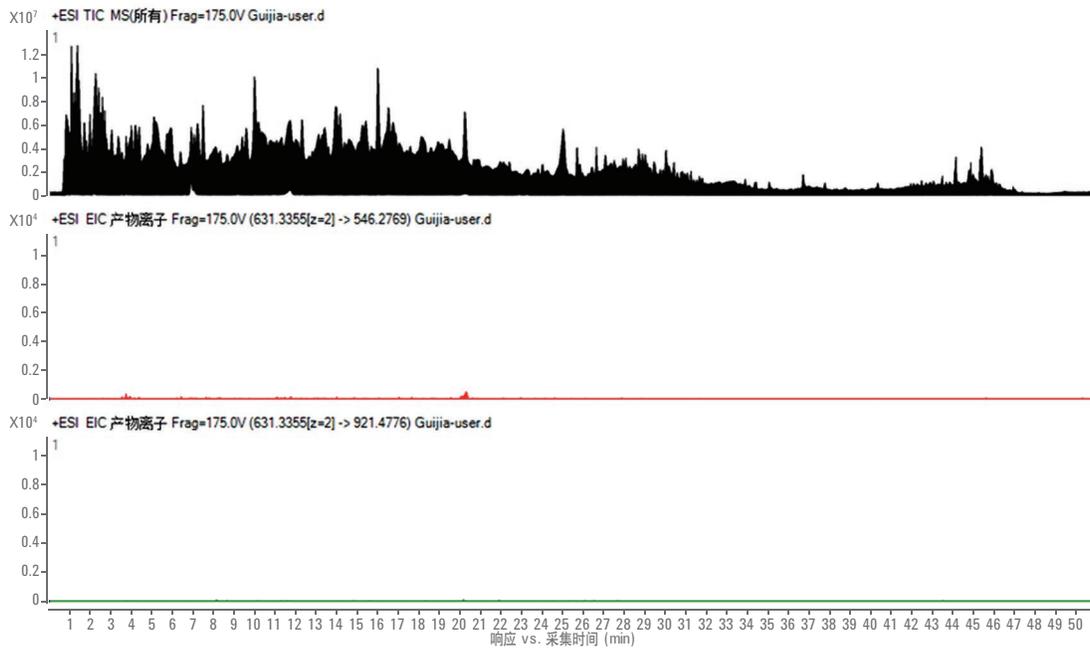


图 6. 某市龟鳖甲胶未检出龟鳖胶特征性离子，从上到下依次为：MS 总离子流图、通道 631.3→546.4 和 631.3→921.4 的提取离子流图

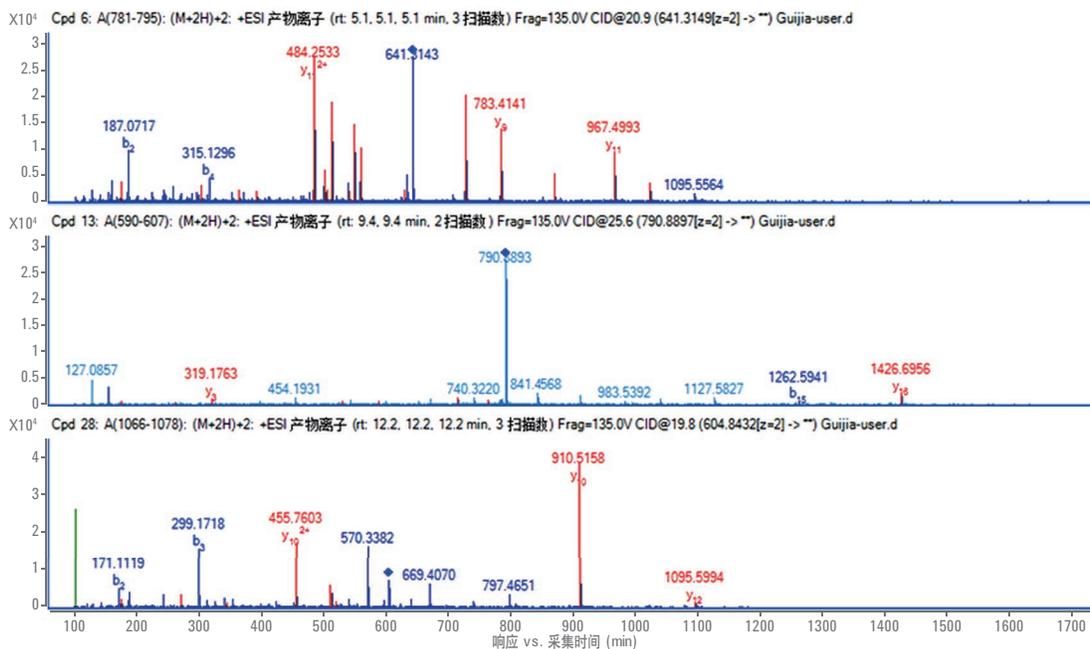


图 7. 某市龟鳖甲胶中发现的牛皮胶原蛋白特异性肽段，从上到下依次为：牛皮胶 I 型胶原蛋白  $\alpha 1$  链上第 781 – 795 氨基酸序列、 $\alpha 2$  链上第 950 – 607 氨基酸序列、 $\alpha 2$  链上第 1066 – 1078 氨基酸序列

## 结论

分别采用 Agilent 6400 系列 QQQ 和 6500 系列 Q-TOF 液质联用系统，针对 2015 版药典收载的阿胶、龟甲胶、鹿角胶三种胶类药材进行定性方法开发，结果表明，阿胶、龟甲胶、鹿角胶的信噪比远远优于药典的要求。在此基础上，开发了胶类药品的专属肽段鉴别方法以及特征肽段序列分析方法，并将特征肽段分析成功应用于一例“假龟甲胶”的鉴别中。

## 参考文献

- [1] 《中国药典》2015 年版第一部
- [2] 《胶类药材质量控制关键技术研究》北京中医药大学博士论文，作者：程显隆
- [3] Xian-Long Cheng et.al. Identification of five gelatins by ultra performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry (UPLC/Q-TOF-MS) using principal component analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 62 (2012) 191– 195

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

安捷伦科技大学：

<http://www.lscs-china.com.cn/agilent>

浏览和订阅 Access Agilent 电子期刊：

[www.agilent.com/chem/accessagilent-cn](http://www.agilent.com/chem/accessagilent-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2015  
2015年8月21日，中国印刷  
5991-6178CHCN



**Agilent Technologies**