

超高效液相色谱-质谱法鉴别 蛤蚧定喘丸中的龟鳖甲类成分

殷红军, 吴越, 华小懿, 丁晴, 张瑾*

(无锡市药品安全检验检测中心, 无锡 214000)

摘要: **目的** 建立蛤蚧定喘丸中龟鳖类成分的检测方法。**方法** 借鉴动物类药材特征肽鉴别方法, 采用胰蛋白酶对不同批次的蛤蚧定喘丸样品进行酶解, 利用超高效液相色谱-质谱(UPLC-MS/MS)法, 选择龟鳖类特征分子离子峰作为检测离子对, ESI+模式, 进行多反应监测模式检测。**结果** 8家生产企业共51批蛤蚧定喘丸样品中均检出鳖甲成分, 未检出其他龟鳖源成分。**结论** 该方法专属性较好, 可用于蛤蚧定喘丸中龟鳖类成分掺伪检测。

关键词: 蛤蚧定喘丸; 鳖甲; 龟甲; 特征肽; 超高效液相色谱-质谱

Identification of Testudinis Carapax et Plastrum and Trionycis Carapax Form Ge jie Ding chuan Pill base on UPLC-MS/MS

YIN Hong-jun, WU Yue, HUA Xiao-Yi, DING Qing, ZHANG Jin*

(Wuxi Institute of Drug Safety Control, Wuxi 21400, China)

ABSTRACT: Objective To develop an ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) to identification of the feeding status of turtle and turtle shell components in different batches of Gejie Dingchuan Pills. **Methods** This study used the identification method of characteristic peptides of Animal medicine for reference, Enzymatic hydrolysis of different batches of Ge jie Ding chuan Pill samples using trypsin, and Identification by using the ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The characteristic ion pairs of Testudinis Carapax et Plastrum and Trionycis Carapax were as detection ion pairs. The positive electrospray ionization and multiple reaction monitoring were adopted. **Result:** 51 batches of Gejie Ding chuan Pills form 8 companies have all detected turtle shell components, but no other turtle source components have been detected. **Conclusion** This method is reliable for identification of Testudinis Carapax et Plastrum and Trionycis Carapax form Ge jie Ding chuan Pill.

KEY WORDS: Gejie Ding chuan Pill; Testudinis Carapax et Plastrum; Trionycis Carapax; characteristic ion; UPLC-MS/MS

基金项目: 江苏省市场监督管理局科技计划项目《动物药和矿物药质量控制的研究》项目编号: KJ2023044 项目; 中国药品监管科学行动计划第二批重点项目《中药有效性安全性评价及全过程质量控制研究》, 课题名称: 龟鳖类药材与饮片质量控制和评价研究, 课题编号: NMPAJGKX-2023-045

Fund: Supported by Fund project: Science and Technology Plan Project of Jiangsu Provincial Administration for Market Regulation "Research on the Quality Control of Animal Drugs and Mineral Drugs" Project Number: KJ2023044 Project; the second batch of key projects of the China Drug Supervision Scientific Action Plan "Effectiveness and Safety Evaluation of Traditional Chinese Medicine and the Whole Process "Quality Control Research", Project Name: Research on Quality Control and Evaluation of Turtle Medicinal Materials and Decoction Pieces, Project Number: NMPAJGKX-2023-045

*通信作者: 张瑾, 硕士研究生, 副主任中药师, 研究方向为中药真伪鉴别与质量评价。E-mail: yinspire@126.com

*Corresponding author: ZHANG Jin, Master, Deputy Chief Chinese Pharmacist, Wuxi Institute of Drug Safety Control, Wuxi 21400, China. E-mail: yinspire@126.com

0 引言

蛤蚧定喘丸具有滋阴清肺, 止咳平喘的功效, 由鳖甲、蛤蚧、麻黄等十四味药生粉组成, 为临床常用止咳平喘类处方药物, 现收载于《中国药典》2020 年版一部, 同时收录于国家基本药物目录中^[1]。鳖甲具有滋阴潜阳, 退热除蒸, 软坚散结等功效, 为该处方臣药。本课题组在前期研究、市场、文献调研中发现, 该丸剂中含有的龟鳖类动物类药材存在一定混伪、掺伪情况^[2], 如近年来引进的佛里达鳖和角鳖大量养殖, 其背甲售价远低于鳖甲, 导致市场上鳖甲中常混入佛里达鳖和角鳖等伪品, 同时也存在龟鳖甲饮片混用的情况。由于龟鳖甲类药材品种基原较为混乱, 其原料药的质量问题必然影响到含该类成分的中成药质量安全。

目前龟鳖甲类药材主要依靠传统的性状鉴别, 混伪品难以从性状区分, 且药材饮片经过提取或粉碎, 其特有的性状消失, 更加难以对含龟鳖甲类成分的中成药进行质量监管。近年来, 特征肽鉴别技术在动物类药材检测中应用越来越广泛^[3-7], 《中国药典》2020 年版中阿胶、龟甲胶和鹿角胶鉴别项下均采用了液相色谱串联三重四级杆质谱法, 利用特征肽检测以鉴别该类品种的真伪。基于特征肽的“检出”或“未检出”可实现动物类药的种属鉴别, 该方法具有高专属性强的优点, 能有效鉴别混伪品。因此本文从龟鳖甲类动物药掺伪鉴别作为切入点, 利用超高效液相色谱-串联质谱技术, 采用多重离子对监测(MRM)方法, 对市场上收集的 8 家生产企业的 51 批蛤蚧定喘丸样品进行特征肽检测, 考察样品中龟鳖类成分投料和掺伪情况。

1 材料与方法

1.1 仪器

安捷伦 1290 Infinity II 型超高效液相色谱-三重四极杆液质联用仪(AB SCIEX 4500Q-trap); XS205 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司), IN160plus 培养箱(德国 memert 公司)。

1.2 试剂与材料

胰蛋白酶(序列分析级, Sigma 公司); 碳酸氢铵(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 乙腈为(质谱纯, 德国 Merck 公司); 甲酸(质谱纯, Themrmo Fisher 公司); 超纯水为 Milli-O 纯水。

鳖 *Trionyx sinensis* Wiegmann、佛罗里达鳖 *Apalone ferox*(Schneider)、角鳖 *Apalone spinifera*、乌龟 *Chinemys reevesii*(Gray), 以上样品来自活龟鳖宰杀、药材市场购买, 均由无锡市药品安全检验检测中心丁晴主任药师鉴定。8 家生产企业的 51 批蛤蚧定喘丸样品均来源于 2022 年国家药品评价性抽检, 均保存于无锡市药品安全检验检测中心中药室标本留样间。

1.3 实验方法

1.3.1 色谱-质谱条件及系统适用性试验

采用 waters ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱设置为(0~25 min, A: 5%→20%; 25~55 min, A: 5%→20%); 流速为 0.3 mL/min; 柱温为 40°C; 进样量为 5 μL。以串联质谱仪为检测器, 电喷雾离子源(ESI⁺), 采用多重反应监测(MRM)模式, 对表 1 中特征肽目标离子进行检测。

取鳖甲对照药材溶液, 进样 2 μL, (m/z)784.90(双电荷)→872.46 和(m/z)784.90(双电荷)→1028.55 的 MRM 提取离子对色谱峰的信噪比均大于 3:1。

表 1 特征离子 MRM 参数
Table 1 MRM parameters of characteristic peptide

种名	保留时间 (min)	母离子 m/z	子离子 m/z	离子模式	碰撞能量/eV
鳖	15.2	784.9	872.4	正	30
			1028.5	正	30
佛罗里达鳖	2.9	551.7	675.3	正	30
			143.0	正	20
角鳖	17.6	932.1	743.3	正	45
			1100.0	正	45
龟甲	8.3	442.7	631.0	正	30
			560.0	正	20

1.3.2 溶液的制备

对照药材溶液: 取对照药材粉末(过 4 号筛)各 0.3 g, 精密称定, 置 150 mL 圆底烧瓶中, 加入 50 mL 超纯水, 称定质量, 加热回流 1 h, 放冷, 超纯水补足减失的质量, 加入 0.5 g 碳酸氢铵, 溶解并摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 100 μL 至内衬管中, 加入 20 μL 胰蛋白酶溶液(取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

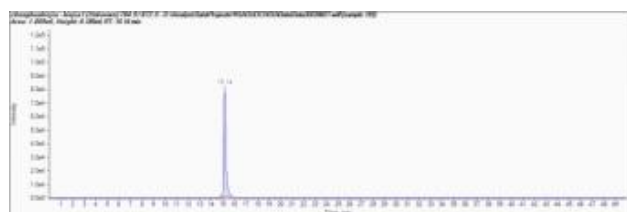
的溶液, 临用时配制), 摇匀, 37°C 恒温酶解 12 小时, 即得。

供试品溶液: 取蛤蚧定喘丸水蜜丸或小蜜丸, 研细(大蜜丸剪碎加等量硅藻土后研细); 精密称取上述样品粉末 6.0 g(大蜜丸 12.0 g), 置 150 mL 圆底烧瓶中, 加入 50 mL 超纯水, 称定质量, 加热回流 1 h, 放冷, 超纯水补足减失的质量, 加入 0.5 g 碳酸氢铵, 溶解并摇匀, 滤过, 精

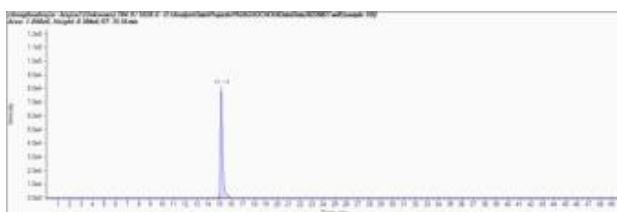
密吸取续滤液 100 μL 至内衬管中, 加入 20 μL 胰蛋白酶溶液(取序列分析用胰蛋白酶, 加 1% 碳酸氢铵溶液制成每 1 mL 中含 1 mg 的溶液, 临用时配制), 摇匀, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温酶解 12 小时, 即得。

阴性样品溶液: 根据处方组成制备不含鳖甲成分的阴性样品, 再按上述“供试品溶液”项下方法制备, 即得。

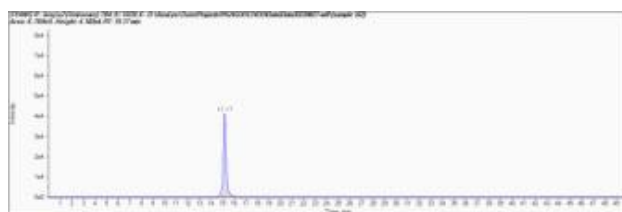
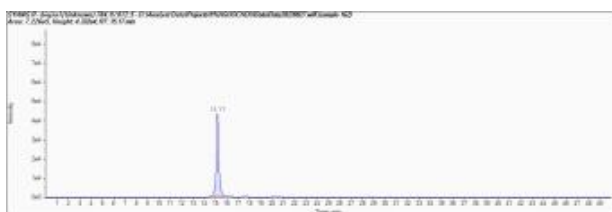
2 结果与分析



A 鳖甲对照药材



B 阳性样品



C 阴性样品

图1 龟鳖类成分离子色谱图

Fig.1 Ion chromatograms of turtle and turtle shell

2.2 检测限

在“1.3.1”项条件下, 将对照药材溶液逐步稀释后进行检测, 以信噪比 3:1 为检测限, 测得鳖甲检测限为 0.1 g/L。

2.3 重复性试验

取同批号的蛤蚧定喘丸 6 份, 按“1.3.2”项下方法制备供试品溶液, 采用鳖甲特征肽质荷比(m/z)784.90(双电荷) \rightarrow 872.46 和(m/z)784.90(双电荷) \rightarrow 1028.55 在“2.1”项条件下进行检测, 结果显示各样品中均检出上述鳖甲特征肽, 表明该方法重复性良好。

2.4 稳定性试验

取对照药材适量, 按“1.3.2”项下方法制备供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、16、24 h 在“2.1”项条件下进行测定,

2.1 专属性试验

按“阴性样品溶液”项下方法制备蛤蚧定喘丸的阴性样品溶液, 再按照处方组成比例制备含鳖甲成分的阳性样品, 按“供试品溶液”项下方法制备阳性对照溶液, 并在“1.3.1”项条件下进行检测。结果显示, 在阳性对照溶液色谱图中相应位置上, 阴性样品中未出现相应特征离子对色谱峰, 表明该方法具有良好的专属性。各离子色谱图见图 1。

鳖甲峰面积 RSD 为 1.9% ($n=6$), 表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5 样品测定

根据拟建立的方法对 51 批蛤蚧定喘丸样品进行检测, 均检出有鳖甲成分, 未检出其他龟鳖类成分, 但其中 2 批样品中峰面积较小(但大于检测限), 推测可能是生产时鳖甲投料量太少。

3 讨论

我国在临床使用广泛鳖甲和龟甲, 同时许多补虚补阴类中成药的含有此类成分。但由于龟鳖甲药材物种基源混乱, 如鳄龟、佛罗里达鳖等混入龟鳖甲类药材中^[2]严重影响对含龟鳖类成分的中成药质量, 因此有必要对此类药材

进行更深入的研究。但传统的性状、显微鉴别对龟鳖类药材具有一定的局限性, 尤其是对含此类药材成分的中成药鉴别更是无能为力。

近年来, 动物类中药质量控制研究越发受到重视, 尤其是利用特征肽为检测指标, 运用液相质谱联用技术建立的质量控制方法^[8-16]。如发现了阿胶特征肽(m/z539.8; m/z578.3; m/z765.9), 龟甲胶特征肽(m/z631.3; m/z758.4; m/z745.8), 鹿角胶特征肽(m/z765.4; m/z732.8)等, 而其中一些的特征肽检测方法已被应用于国家法定标准中, 但仅针对某些单品种动物类药, 而对含动物类药物的中成药研究报道较少。

本研究中采用胰蛋白酶对含龟鳖甲类成分的 8 家生产企业的 51 批蛤蚧定喘丸进行酶解处理, 分别以龟鳖甲类特征肽为检测指标, 建立了蛤蚧定喘丸中龟鳖类成分检测方法, 通过方法学考察, 表明该鉴别方法专属性高、灵敏度高、重复性好、阴性无干扰, 可用于蛤蚧定喘丸中龟鳖类成分投料考察。从实验结果上分析, 样品中均检出鳖甲成分, 未检测出其他龟鳖成分, 但发现 2 批样品中峰面积较小(但大于检测限), 推测可能是生产时鳖甲投料量太少。另研究发现, 在蛤蚧定喘丸样品前处理方法考察中, 加热回流提取的样品峰面积明显高于超声提取的峰面积, 提示加热回流提取方法效率高, 效果较好。下一步, 课题组将拟建立含龟鳖类成分中成药特征离子含量测定方法, 并应用于该类中成药的质量控制, 以服务药品监管, 保障人民群众的用药安全。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [2] 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.
- [3] 李明华, 龙国友, 程显隆, 等. 超高效液相色谱-三重四极杆质谱法用于中成药中胶类成分的检测研究[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(24): 2151-2153.
- [4] 刘东升, 张明童, 刘婷婷, 等. 超高效液相色谱-三重四极杆质谱法检测含胶类中药结核丸中阿胶及牛皮源成分的研究[J]. 现代医药卫生, 2020, 36(21): 3389-3393.
- [5] 刘宇文, 杨直, 谌宇, 等. 液质联用多肽识别技术鉴别鳖甲胶的研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(24): 3061-3063.
- [6] 刘宇文, 张伟, 潘佳星, 等. 固相萃取-液质联用法用于乌鸡白凤丸中动物药的质量控制初探[J]. 中国药师, 2020, 23(8): 1535-1539.
- [7] 醋鳖甲配方颗粒, 广东省中药配方颗粒质量标准: 2021[S].
- [8] 钱敏, 刘宇文, 刘晓华, 等. 基于 UPLC-QTOF-MS 技术鉴别

10 种龟鳖类中药的真伪[J]. 中华中医药杂志, 2022, 36(7): 3434-3440.

- [9] 王玉团, 石峰, 杭宝建. 超高效液相色谱串联三重四级杆质谱测定羚羊角中羚羊角肽的含量[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(7): 3698-3701.
- [10] 谢强胜, 高天阳, 孙铜, 等. 基于酶解法采用超高效液相色谱-串联质谱法检测阿胶、黄明胶、鹿角胶中猪皮特征肽[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(1): 166-171.
- [11] 刘睿, 赵明, 刘晓, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测水牛角特征肽[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(5): 1279-1285.
- [12] 李明华, 郭晓晗, 柳温曦, 等. 超高效液相色谱-三重四极杆质谱法用于阿胶、龟甲胶、鹿角胶中猪皮源成分的检测[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(5): 859-864.
- [13] 焦阳, 汪冰, 周倩倩, 等. 超高效液相色谱-质谱联用技术检测阿胶中马皮源成分[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(5): 864-869.
- [14] 褚夏燕, 孙梦茹, 贾贵华, 等. 基于 nano LC-Q-Exactive-MS/MS 技术分析阿胶中的蛋白多肽类物质[J]. 中国中药杂志, 2021, 46 (24): 6422-6434.
- [15] 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.
- [16] 李广华, 龙萍, 尹雪, 等. 高效液相色谱-三重四极杆质谱法检测暖宫孕子丸中阿胶特征肽成分[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(4): 694-697.

(责任编辑: 吴华)

作者简介

殷红军, 硕士, 药物化学专业, 主管药师, 中药检验员, 研究方向为中药检验。

张瑾, 硕士, 副主任中药师, 研究方向为中药真伪鉴别与质量评价。

E-mail: yinspire@126.com