

蒋文丽, 朱晓滢, 钟铭慧, 等. 阿胶制品中典型明胶特征性多肽的鉴定 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(12): 73-80. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022080302

JIANG Wenli, ZHU Xiaotian, ZHONG Minghui, et al. Identification of Characteristic Peptides from Typical Gelatin in Ejiao Products[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(12): 73-80. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022080302

· 研究与探讨 ·

阿胶制品中典型明胶特征性多肽的鉴定

蒋文丽¹, 朱晓滢¹, 钟铭慧¹, 谢作桦², 芦 玲², 涂宗财^{1,3}, 沙小梅^{1,2,*}

(1. 江西师范大学生命科学学院, 国家淡水鱼加工技术研发专业中心, 江西南昌 330022;

2. 江西德上制药股份有限公司, 江西樟树 331208;

3. 南昌大学, 食品科学与技术国家重点实验室, 江西南昌 330047)

摘 要: 为了研究不同类型阿胶制品中典型明胶的来源, 本文选取 9 种市面上常见的阿胶制品 (阿胶糕、阿胶口服液和阿胶颗粒各 3 种) 为研究对象, 分别添加质量分数为 1% 的牛明胶和猪明胶, 采用高效液相色谱-高分辨率质谱联用技术 (high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS/MS) 鉴定这 9 种阿胶制品中典型明胶的特征性多肽。结果表明, 不同数量的典型明胶特征性多肽被检出于 9 种阿胶制品。进一步分析发现, 所有阿胶制品共有的阿胶、牛明胶、猪明胶的特征性多肽分别为 25、3、14 条, 其中, 未经修饰的特征性多肽依次为 7、2、3 条。在上述共有特征性多肽中, 源自 α_1 链的分别有 22、2、5 条, 源自 α_2 链的分别为 3、1、9 条。这些共有特征性多肽可作为 HPLC-MS/MS 鉴定复杂体系中明胶来源的依据, 对不同阿胶制品中明胶来源的鉴定具有指导意义。

关键词: 阿胶制品, 典型明胶, 特征性多肽, HPLC-MS/MS

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)12-0073-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022080302

本文网刊:



Identification of Characteristic Peptides from Typical Gelatin in Ejiao Products

JIANG Wenli¹, ZHU Xiaotian¹, ZHONG Minghui¹, XIE Zuohua², LU Ling², TU Zongcai^{1,3}, SHA Xiaomei^{1,2,*}

(1. National R&D Center for Freshwater Fish Processing, College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China;

2. Jiangxi Deshang Pharmaceutical Co., Ltd., Zhangshu 331208, China;

3. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: In order to study the source of typical gelatin in different types of Ejiao products, nine common Ejiao products on the market including three kinds of Ejiao cake, Ejiao oral liquid and Ejiao granule, were selected as the research objects. Moreover, 1% bovine gelatin and porcine gelatin were added in Ejiao products, respectively. High-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS/MS) was used to identify the characteristic peptides of typical gelatin including donkey gelatin, bovine gelatin, and porcine gelatin. The results showed that different characteristic peptides of typical gelatin were detected in nine kinds of Ejiao products. Through further analysis, it was found that the common characteristic peptides of donkey gelatin, bovine gelatin, and porcine gelatin shared by these 9 Ejiao products were 25, 3, and 14, respectively, where the unmodified characteristic peptides were 7, 2, and 3 in turn. Among them, 22, 2, and 5 common characteristic peptides were derived from the α_1 chain, respectively. Meanwhile, 3, 1, and 9 common characteristic peptides were derived from the α_2 chain, respectively. These common characteristic peptides could be used as the basis for the identification of gelatin sources in complex systems by HPLC-MS/MS, and give guiding significance in gelatin

收稿日期: 2022-08-31

基金项目: 江西省自然科学基金项目 (20212BAB215022); 国家现代农业产业技术体系 (CARS-45); 国家自然科学基金 (32160576)。

作者简介: 蒋文丽 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 绿色食物资源的高值化利用, E-mail: 3501963779@qq.com。

* 通信作者: 沙小梅 (1987-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 绿色食物资源的高值化利用, E-mail: shaxiaomei1987@sina.com。

identification for different Ejiao products.

Key words: Ejiao products; typical gelatin; characteristic peptides; high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS/MS)

阿胶作为我国特有的一种名贵中药,有着“补血圣药”之称^[1]。现代药理研究结果显示,阿胶不仅具有止血、补血的作用,而且在抗疲劳、抗氧化、抗肿瘤、提高免疫力、耐缺氧等方面具有一定的疗效^[2]。近年来,为了满足阿胶市场的需要,阿胶制品的类型得以不断丰富,如阿胶糕是阿胶的延伸类产品,因其具有滋补养颜、增强抵抗力等复合保健功效而具有悠久的食用历史^[3];由阿胶改良后的颗粒剂制品-阿胶颗粒相比阿胶更方便服用,其中熟地黄、党参、黄芪、枸杞等多样化辅料的添加也对人体健康有益^[4-5];阿胶类口服液常由阿胶和其他中药材混合熬制而成,是一种服用方便、质量稳定的制剂^[6],具有提高细胞免疫、体液免疫和补血补肾的功能^[7-9]。现今,人们对阿胶制品的大量需求导致驴皮资源紧缺,阿胶价格逐年上涨^[10-11],进而不法商家使用其它明胶替代阿胶制成假冒伪劣的阿胶制品并流通于市场,造成了消费者的购买担忧以及对产品真假性的质疑^[12-13]。因此,对阿胶制品中明胶的来源进行鉴别和溯源对帮助阿胶行业打假、树立消费者购买信心具有重要的意义。

高效液相色谱-高分辨率质谱技术(high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS/MS)是一项公认的能够准确鉴定明胶来源的技术,具有针对性强、灵敏度高等优点^[14-15],如 HPLC-MS/MS 不仅可以鉴别来自马皮明胶、牛皮明胶和驴皮明胶的特征性多肽^[16],还能定量检测目标明胶在明胶混合物中的含量^[12]。除此之外,质谱技术还能检测出非明胶混合物复杂体系中的阿胶,如陈鸿玉等^[17]利用 HPLC-MS/MS 测定了妇科止带片中的阿胶。目前,HPLC-MS/MS 鉴定明胶来源主要存在于相关理论研究,而应用于阿胶类产品中明胶的鉴定研究非常少。虽然课题组前期也利用 HPLC-MS/MS 鉴定出 4 种阿胶块产品中不同明胶(阿胶、猪明胶和牛明胶)的共有特征性多肽数量、氨基酸序列和修饰情况^[18],但阿胶市场中占比越来越大的阿胶制品中明胶的来源鉴定还未被深入探究。此外,相较原材料种类较少的阿胶块而言,不同的阿胶制品将存在多种原辅料、产品剂型、加工工艺等因素引起的综合影响。因此,利用 HPLC-MS/MS 技术准确鉴定各类阿胶制品中明胶的来源值得深入研究和探索。

本文以 3 种类型阿胶制品,包括阿胶糕(东阿桃花姬阿胶糕、福牌阿胶糕、同仁堂阿胶糕)、阿胶颗粒(驴胶补血颗粒、阿归养血颗粒、阿胶补血颗粒)、阿胶口服液(复方阿胶浆、阿胶补血口服液、阿胶益寿口服液)为研究对象,分别添加质量分数 1% 的牛明胶和猪明胶,再通过 HPLC-MS/MS 检测并鉴定出阿胶制品中典型明胶的特征性多肽。阿胶制品中阿

胶、低含量牛明胶和猪明胶的特征性多肽数据库的建立可为明胶的准确溯源提供依据,对阿胶制品的品质保障具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

阿胶糕 东阿桃花姬阿胶糕、福牌阿胶糕、同仁堂阿胶糕分别来自东阿阿胶股份有限公司、山东福牌阿胶股份有限公司、北京同仁堂科技发展股份有限公司;阿胶颗粒 驴胶补血颗粒、阿归养血颗粒、阿胶补血颗粒分别来自九芝堂股份有限公司、江西新远健有限公司和东阿阿胶股份有限公司;阿胶口服液 复方阿胶浆、阿胶补血口服液、阿胶益寿口服液产品分别来自东阿阿胶股份有限公司、山东福牌阿胶股份有限公司、仁和药业有限公司。

牛皮明胶、猪皮明胶、乙腈、甲酸(FA)、碳酸氢铵(NH_4HCO_3) 美国 Sigma 公司;胰蛋白酶(19385 U/mg) 美国 Promega Corporation 公司;尿素、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、碘乙酰胺($\text{C}_2\text{H}_4\text{INO}$, IAA) 上海 Bio-Rad 实验室。

RP-C₁₈ 色谱柱(75 μm ×150 mm, 5 μm) 安捷伦科技有限公司;EASY-nLC™ 1000 色谱系统、Q-Exactive 质谱仪 美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Nanosep 10K Omega 离心机 德国 Eppendorf 公司;LGJ-1D-80 型冷冻干燥机 北京亚泰科隆仪器技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 9 种阿胶制品的处理 参考沙小梅等^[18]的实验方法并稍做修改。3 种阿胶糕样品和 3 种阿胶颗粒样品于 50 $^{\circ}\text{C}$ 去离子水中溶解后制成 100 mg/mL 的阿胶制品溶液,分别加入质量分数为 1% 的牛明胶和猪明胶后搅拌均匀,14000×g 离心 25 min 后取上清液过滤(0.45 μm),冻干备用。复方阿胶浆、阿胶补血口服液、阿胶益寿口服液用水分测定仪测出固形物含量分别为 21.75%、30.66% 和 15.52%,后按以上阿胶糕和阿胶颗粒的步骤得到冻干样品。

1.2.2 样品的酶解 参照 Sha 等研究的方法进行酶解^[19]。冻干后的样品溶解于 SDT 缓冲液(4% SDS、100 mmol/L DTT、150 mmol/L pH8.0 Tris-HCl)制成 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 溶液,煮沸 3 min 后以 12000×g 离心 15 min。取上清液于 10 kDa 超滤离心管,加入 200 μL 尿素裂解液(8 mol/L 尿素,150 mmol/L pH8.0 Tris-HCl)后 14000×g 离心 15 min,重复此操作 1 次。之后,加入 100 μL 50 mmol/L IAA 溶液,于暗室放置 30 min 后 14000×g 离心 15 min。取上清液后加入 100 μL 尿素裂解液后以 14000×g 离心 15 min,重复此操作 2

次。向上清液中加入 100 μL 的 25 mmol/L NH_4HCO_3 溶液并离心,重复操作 2 次。最后加入 40 μL 25 mmol/L NH_4HCO_3 溶液(含 2 μg 胰蛋白酶),37 $^\circ\text{C}$ 孵育 16 h 后 14000 $\times g$ 离心 20 min 收集滤液。

1.2.3 高效液相色谱-质谱检测 将收集的滤液经毛细管高效液相色谱分离后用 Q-Exactive 质谱仪进行质谱分析,液相色谱分离柱为 C_{18} 柱。在 250 nL/min 流速下,流动相 A(体积分数 0.1% 甲酸的水溶液)线性梯度洗脱至流动相 B(体积分数 84% 的乙腈溶液、含有体积分数 0.1% 的甲酸)。MS 数据从 300~1800 m/z 范围内获得后再进行 HCD 裂解。目标值的确定基于预测性自动增益控制(pAGC)。

1.3 数据处理

采用 MASCOT 软件进行匹配分析,目标胶原蛋白(驴皮、牛皮和猪皮胶原蛋白)数据库已设置。为了准确识别肽段,一些参数设置为如下条件:氧化修饰(M、P、K);最大的未酶切位点为 2;肽段容错率为 $\pm 20 \times 10^{-6}$;酶解碎片容错率为 ± 0.1 Da。当 Mascot 分数大于 40 时,多肽峰被认定为阳性^[20]。此外,将依据课题组前期建立的三种胶原蛋白理论特征性多肽数据库比对分析阿胶、牛明胶和猪明胶特征性多肽^[21]。

2 结果与分析

2.1 9 种阿胶制品中阿胶、牛明胶和猪明胶的特征性多肽综合性分析

本实验选取阿胶市场上比较常见的阿胶糕(东阿桃花姬阿胶糕、福牌阿胶糕、同仁堂阿胶糕)、阿胶颗粒(驴胶补血颗粒、阿归养血颗粒、阿胶补血颗粒)和阿胶口服液(复方阿胶浆、阿胶补血口服液和阿胶益寿口服液)为研究对象,分别向其中添加质量分数为 1% 的猪明胶和牛明胶,再利用 HPLC-MS/MS 对三类阿胶产品中的阿胶、牛明胶和猪明胶的特征性多肽进行鉴定分析。由表 1 可知,阿胶糕产品-福牌阿胶糕、东阿桃花姬阿胶糕和同仁堂阿胶糕中检测出 212、222 和 256 条明胶特征性多肽;阿胶颗粒产品-驴胶补血颗粒、阿归养血颗粒和阿胶补血颗粒中分别有 281、258 和 200 条明胶特征性多肽被鉴定出;阿胶口服液产品-复方阿胶浆、阿胶补血口服液和阿胶益寿口服液中分别鉴定出 195、203 和 165 个明胶特征性多肽。如表 1 所示,在 9 种阿胶制品(福牌阿胶糕、东阿桃花姬阿胶糕、同仁堂阿胶糕、驴胶补血颗粒、阿归养血颗粒、阿胶补血颗粒、阿胶补血口服液、阿胶益寿口服液、复方阿胶浆)中发现来自阿胶的特征性多肽分别有 112、68、193、67、26、24、109、11、10 条;同样,21、121、35、23、41、31、19、30、38 个牛明胶特征性多肽和 79、33、28、191、191、145、75、124、147 个猪明胶特征性多肽分别在这些产品中被鉴定出。由此可见,在不同阿胶制品中,所含有的阿胶特征性多肽数量均会存在差别。另

外,虽然同样比例的猪、牛明胶被添加到阿胶制品中,但在不同阿胶制品中检测筛选出的猪、牛明胶特征性多肽数量也大不相同。阿胶与猪明胶和牛明胶类似,加热温度、提取时间、酸碱性等会对其分子链的断裂产生不同程度的影响,进而干扰其溯源性^[22]。另外,鉴定过程导致的明胶稀释也会降低目标明胶特征性多肽的检出数目^[22];不同类型甚至是同类型不同品牌的阿胶制品也可能会因制作工艺和辅料添加的不同及物质间的相互作用而对目标明胶的检出效果产生不同程度的影响。因此,探究不被制作工艺和辅料影响的共有典型明胶特征性多肽对于阿胶制品的溯源鉴定非常关键。

表 1 9 种阿胶制品中的特征性多肽
Table 1 Characteristic peptides in nine Ejiao products

样品	检测出的 总多肽数	驴皮明胶的 多肽数	猪皮明胶的 多肽数	牛皮明胶的 多肽数
福牌阿胶糕	212	112	79	21
东阿桃花姬阿胶糕	222	68	33	121
同仁堂阿胶糕	256	193	28	35
驴胶补血颗粒	281	67	191	23
阿归养血颗粒	258	26	191	41
阿胶补血颗粒	200	24	145	31
阿胶补血口服液	203	109	75	19
阿胶益寿口服液	165	11	124	30
复方阿胶浆	195	10	147	38

2.2 9 种阿胶制品中阿胶的共有特征性多肽

为降低原料基质、阿胶用量等因素对阿胶鉴定的负面影响,筛选不同阿胶制品中阿胶的共有特征性多肽是非常关键的环节。如表 2 所示,25 条来自阿胶的共有特征性多肽在这 9 种阿胶制品中被筛选出,其中来自于 α_1 链的占比 88%。未被修饰的 7 条共有特征性多肽依次是来自于 α_2 链的相对较短的一条多肽¹⁰⁵²GPAGPTGPVGK¹⁰⁶²,以及来自 α_1 链的⁵⁹⁸GVPGPPGAVGPAGK⁶¹¹、⁶¹²DGEAGAQQPPG PAGPAGER⁶³⁰、¹⁰⁶⁶GEAGPAGPAGPIGPVGAR¹⁰⁸³、⁴⁹³GFPGADGVAGPK⁵⁰⁴、²⁶⁸GFSGLDGAK²⁷⁶和¹⁰⁶²SG DRGEAGPAGPAGPIGPVGAR¹⁰⁸³。肽段鉴定的难度会随着修饰情况的复杂程度增大而增加,那些未被修饰的肽段在质谱峰鉴定中更易被识别而受人青睐^[19,23]。在识别和匹配的过程中,这些未被修饰的肽段在裂解过程中产生的碎片离子更具有优势,能有效提升质谱峰鉴定过程中的容易度,从而提高多肽鉴定的准确度。例如,如图 1 所示,A、B 分别表示 9 种阿胶制品中共有的 2 条不含修饰基团的特征性多肽的二级质谱图,这两条来自阿胶 α_1 链的特征性多肽序列为⁴⁹³GFPGADGVAGPK⁵⁰⁴(m/z 536.7750²⁺)和¹⁰⁶⁶GEAGPAGPAGPIGPVGAR¹⁰⁸³(m/z 765.9035²⁺)。这两条多肽序列的一级质谱峰 error 值均低于 2×10^{-6} (表 2),且二级质谱图中一系列的 y 离子和 b 离子能够准确地辨识多肽的序列,免去了修饰基团带来

表 2 阿胶的共有特征性多肽

Table 2 Common characteristic peptides of donkey gelatin

多肽序列	m/z	相对分子质量		
		实测值	理论值	误差(10^{-6})
α_1 - ⁵³⁸ GLTGS*PGSPGPDGK ⁵⁵¹	621.8061 ²⁺	1241.5888	1241.5976	7.09
α_1 - ⁵³⁸ GLTGS*PGS*PGPDGK ⁵⁵¹	629.7993 ²⁺	1257.5837	1257.5840	0.22
α_1 - ⁵⁷⁴ GQAGVMGF*PGPK ⁵⁸⁵	581.2898 ²⁺	1160.5648	1160.5650	0.15
α_1 - ⁵⁷⁴ GQAGV*MGF*PGPK ⁵⁸⁵	589.2870 ²⁺	1176.5598	1176.5594	-0.30
α_2 - ⁸⁸¹ GL*PGVAGSLGE*PGPLGIAGP*PGAR ⁹⁰⁴	1073.0698 ²⁺	2144.1226	2144.1250	1.13
α_1 - ¹¹¹¹ GFSGLQGPFG*PGS*PGEQGPSGASGPAGPR ¹¹⁴⁰	902.4238 ³⁺	2704.2478	2704.2495	0.64
α_1 - ⁵⁹⁸ GV*PGP*PGAVGPAGK ⁶¹¹	596.8194 ²⁺	1191.6248	1191.6242	-0.50
α_1 - ⁵⁹⁸ GVPGP*PGAVGPAGK ⁶¹¹	580.8251 ²⁺	1159.6350	1159.6356	0.55
α_1 - ⁵⁹⁸ GVPGP*PGAVGPAGK ⁶¹¹	588.8224 ²⁺	1175.6299	1175.6302	0.28
α_1 - ⁶¹² DGEAGAQPPGPAGPAGER ⁶³⁰	845.8914 ²⁺	1689.7707	1689.7682	-1.45
α_1 - ⁶¹² DGEAGAQGP*PGPAGPAGER ⁶³⁰	853.8893 ²⁺	1705.7656	1705.7640	-0.92
α_1 - ²⁶⁸ GFSGLDGA*KGDAGPAGPK ²⁸⁵	809.3987 ²⁺	1616.7794	1616.7828	2.08
α_1 - ⁸⁶⁵ GSAGP*PGATGF*PGAAGR ⁸⁸¹	730.3497 ²⁺	1458.6852	1458.6848	-0.25
α_1 - ⁴¹⁵ GPSGPQGPSGP*PGPK ⁴²⁹	666.8299 ²⁺	1331.6470	1331.6452	-1.34
α_1 - ⁴¹⁵ GPSGPQG*PSGP*PGPK ⁴²⁹	674.8291 ²⁺	1347.6419	1347.6436	1.26
α_1 - ¹⁰⁶⁶ GEAGPAGPAGPIGPVGAR ¹⁰⁸³	765.9035 ²⁺	1529.7950	1529.7924	-1.71
α_1 - ⁴⁹³ GFPGADGVAGPK ⁵⁰⁴	536.7750 ²⁺	1071.5349	1071.5354	0.47
α_1 - ⁴⁹³ GF*PGADGVAGPK ⁵⁰⁴	544.7723 ²⁺	1087.5298	1087.5300	0.17
α_1 - ⁹⁷⁰ GF*PGL*PGPSGE*PGK ⁹⁸³	672.8250 ²⁺	1343.6358	1343.6354	-0.26
α_1 - ⁹⁷⁰ GF*PGL*PGPSGEPGK ⁹⁸³	664.8276 ²⁺	1327.6408	1327.6406	-0.17
α_1 - ²⁶⁸ GFSGLDGA ²⁷⁶	851.4263 ¹⁺	850.4185	850.4190	0.64
α_2 - ⁸²⁹ AGETGASGP*PGFAGEK ⁸⁴⁴	724.8362 ²⁺	1447.6579	1447.6578	-0.08
α_1 - ¹⁰⁶² SGDRGEAGPAGPAGPIGPVGAR ¹⁰⁸³	649.3315 ³⁺	1944.9766	1944.9726	-2.04
α_2 - ¹⁰⁵² GPAGPTGPVVK ¹⁰⁶²	469.2590 ²⁺	936.5029	936.5034	0.56
α_1 - ⁷³³ GAAGL*PGPK ⁷⁴¹	392.2215 ²⁺	782.4286	782.4284	-0.29

注: *表示氧化修饰; 表3~表4同。

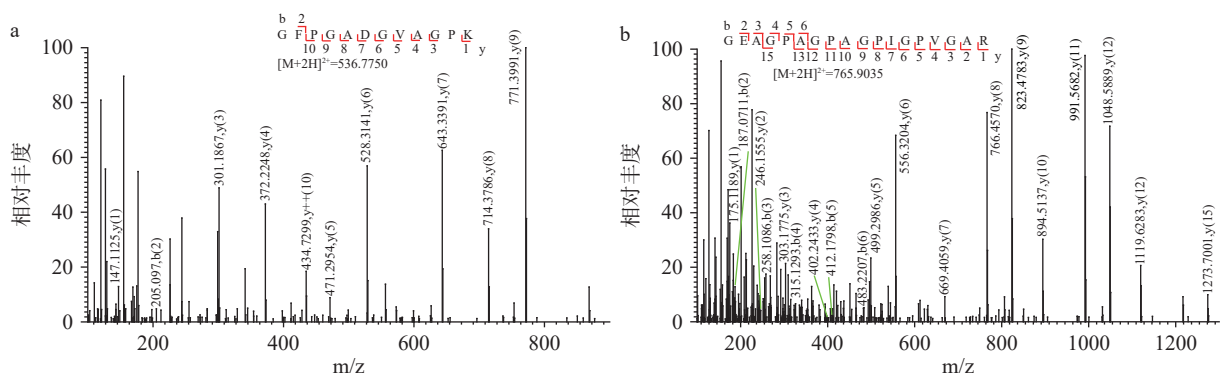


图 1 阿胶中非修饰共有特征性多肽二级质谱图

Fig.1 Non-modified common characteristic peptides of donkey-hide gelatin by tandem mass spectrometry

注: a- α_1 -⁴⁹³GFPGADGVAGPK⁵⁰⁴; b- α_1 -¹⁰⁶⁶GEAGPAGPAGPIGPVGAR¹⁰⁸³。

的鉴定干扰。上述肽段¹⁰⁶⁶GEAGPAGPAGPIGPVGAR¹⁰⁸³(图 1B)和另外几条多肽⁸²⁹AGETGASGP*PGFAGEK⁸⁴⁴、¹⁰⁶²SGDRGEAGPAGPAGPIGPVGAR¹⁰⁸³、⁸⁸¹GL*PGVAGSLGE*PGPLGIAGP*PGAR⁹⁰⁴、¹⁰⁵²GPAGPTGPVVK¹⁰⁶²(表 2)都被课题组前期报道过^[12,18,21]; Liu 等^[24]也通过区别不同明胶样品鉴定出阿胶的特征性多肽⁸²⁹AGETGASGP*PGFAGEK⁸⁴⁴。

因此, 这些多肽稳定性较高, 在阿胶的溯源中可发挥十分重要的作用。

2.3 9 种阿胶制品中牛明胶的共有特征性多肽

牛明胶作为另外一种常见的哺乳动物明胶被广泛运用生产生活中。为了探索低添加牛明胶特征性多肽的检出效果, 每种阿胶制品中均添加质量分数为 1% 的牛明胶。在明胶混合体系中, 低浓度明胶的

检出效率与质谱仪的分辨率密不可分。不同质谱仪分辨两个离子质荷比的能力存在高低之分。一般来说,当分辨率大于或等于 10000 时,该质谱仪将具有高分辨率;而分辨率越高,质谱仪可辨别的物质种类越多,准确性越大。本实验采用的高分辨率质谱仪(m/z 200: 一级质谱分辨率 70000, 二级质谱分辨率: 17500)可以从复杂的基质中高效分离不同峰,其鉴定出的目标多肽的相对分子质量也能达到小数点后四位;而低分辨率质谱仪只能取整数。因此,高分辨率质谱仪可为典型明胶的特征性多肽鉴定保驾护航。另外值得注意的是,每条肽段的一级离子质量容差必须保持在 $\pm 20 \times 10^{-6}$;同时,二级离子质量容差则小于 0.1 Da,且每条确定下来的多肽的检测结果需满足过滤标准(Mascot Score ≥ 40)。如上文“2.1”所述,经过 HPLC-MS/MS 的检测,福牌阿胶糕、东阿桃花姬阿胶糕、同仁堂阿胶糕、驴胶补血颗粒、阿归养血颗粒、阿胶补血颗粒、阿胶补血口服液、阿胶益寿口服液和复方阿胶浆中分别有 21、121、35、23、41、31、19、30、38 个牛明胶特征性多肽,它们共有 3 条牛明胶特征性多肽,其中 2 个来自于 α_1 链,1 个来自于 α_2 链。这 3 条多肽一级质谱峰的 error 值均低于 3×10^{-6} ,且其序列和修饰基团的确定还通过了二级质

谱图的检测,说明这 3 条多肽鉴定的准确度高,可用于阿胶制品中低含量牛明胶的鉴定分析。如表 3 所示,在这些共有特征性多肽中,有 2 个多肽是不包含任何修饰基团的,分别是来自 α_1 链的 $^{1062}\text{SGDRGETGPAGPAGPIGPVGAR}^{1083}$ 和 $^{1066}\text{GETGPAGPAGPIGPVGAR}^{1083}$ 。肽段 $^{1066}\text{GETGPAGPAGPIGPVGAR}^{1083}$ (m/z 为 520.9425^{3+})、 $^{590}\text{GP}^*\text{PGESGAAGPTGPIGS}^{607}$ (m/z 为 527.5933^{3+})和 $^{1062}\text{SGDRGETGPAGPAGPIGPVGAR}^{1083}$ (m/z 为 988.5030^{2+})已多次被报道^[12,22,25-26],表明其用于牛明胶的溯源鉴定具有较高的稳定性。在本文中,当牛明胶在固体物中的占比低至 1% 时,依然可以在 9 种阿胶制品中稳定地检测出这 3 条牛明胶特征性多肽。一般情况下,在质谱峰中同时找到一种蛋白质的两个多肽可证明该蛋白质的存在^[27]。上述结果证明不同剂型阿胶制品中的低含量牛明胶能被 HPLC-MS/MS 有效鉴别出来。

2.4 阿胶制品中猪明胶的共有特征性多肽

在工业生产过程中猪明胶被广泛使用^[20,28],例如,在欧洲,由猪皮制备而成的食用明胶占到了食用明胶总量的 80%^[25]。猪明胶被掺入阿胶产品中以次充好多次被爆出,因而,本文进一步研究了阿胶制品中低含量猪明胶(质量分数为 1%)的特征性多肽。

表 3 牛明胶的共有特征性多肽
Table 3 Common characteristic peptides of bovine gelatin

样品	m/z	相对分子质量		
		实测值	理论值	误差(10^{-6})
α_1 - $^{1062}\text{SGDRGETGPAGPAGPIGPVGAR}^{1083}$	988.5030 ²⁺	1974.9871	1974.9914	2.16
α_2 - $^{590}\text{GP}^*\text{PGESGAAGPTGPIGS}^{607}$	527.5933 ³⁺	1579.7590	1579.7580	-0.66
α_1 - $^{1066}\text{GETGPAGPAGPIGPVGAR}^{1083}$	520.9425 ³⁺	1559.8056	1559.8056	0.01

表 4 猪明胶的共有特征性多肽
Table 4 Common characteristic peptides of porcine gelatin

多肽序列	m/z	相对分子质量		
		实测值	理论值	误差(10^{-6})
α_1 - $^{980}\text{G}^*\text{PPGP}^*\text{MGPPGLAGP}^*\text{PGESGR}^{999}$	916.9335 ²⁺	1831.8523	1831.8524	0.05
α_2 - $^{831}\text{TGETGASGP}^*\text{PGFAGEK}^{846}$	739.8411 ²⁺	1477.6685	1477.6676	-0.60
α_2 - $^{979}\text{GE}^*\text{PGPAGSVGPAGAVGPR}^{996}$	774.8920 ²⁺	1547.7692	1547.7694	0.12
α_1 - $^{1048}\text{SGDRGETGPAGPAGPVGVPVGAR}^{1069}$	981.4937 ²⁺	1960.9715	1960.9728	0.66
α_2 - $^{592}\text{GP}^*\text{PGESGAAGPAGPIGS}^{609}$	775.8815 ²⁺	1549.7485	1549.7484	-0.05
α_1 - $^{451}\text{GEPG}^*\text{PTGVQGP}^*\text{PGPAGEEGKR}^{471}$	1003.4872 ²⁺	2004.9501	2004.9598	4.84
α_2 - $^{574}\text{GI}^*\text{PGEFGL}^*\text{PGPAGPR}^{588}$	485.2526 ³⁺	1452.7361	1452.7359	-0.15
α_1 - $^{1052}\text{GETGPAGPAGPVGVPVGAR}^{1069}$	516.2712 ³⁺	1545.7900	1545.7917	1.13
α_2 - $^{225}\text{VGAPGPAGAR}^{234}$	426.7376 ²⁺	851.4613	851.4606	-0.86
α_2 - $^{225}\text{VGA}^*\text{PGPAGAR}^{234}$	434.7350 ²⁺	867.4562	867.4554	-0.97
α_2 - $^{328}\text{GI}^*\text{PGPAGAAGATGAR}^{342}$	413.8864 ³⁺	1238.6367	1238.6373	0.46
α_1 - $^{475}\text{GE}^*\text{PGPAGL}^*\text{PGP}^*\text{PGER}^{489}$	718.3445 ²⁺	1434.6739	1434.6744	0.34
α_2 - $^{451}\text{GF}^*\text{PGS}^*\text{PGNVGPAGK}^{464}$	637.3141 ²⁺	1272.6099	1272.6136	2.93
α_2 - $^{406}\text{GL}^*\text{PGADGR}^{413}$	379.6929 ²⁺	757.3719	757.3712	-0.86

由表4可知,在9种阿胶制品中猪明胶的共有特征性多肽有14条。如表4所示,5个特征性多肽来自 α_1 链,9个特征性多肽则源自 α_2 链。在这些共有特征性多肽中,不包含任何修饰基团的多肽只有3条,分别是 $^{1052}\text{GETGPAGPAGPVGPVGAR}^{1069}$ 、 $^{1048}\text{SGDRGETGPAGPAGPVGPVGAR}^{1069}$ 和 $^{225}\text{VGAPGPAGAR}^{234}$ 。

如表4所示,11个猪明胶的共有特征性多肽(全部来自于 α_2 链)被鉴定出有羟脯氨酸,占共有特征性多肽总数的78.57%。因此,这些翻译后修饰的多肽(尤其是含有脯氨酸残基羟基化修饰)的准确鉴定不容忽视。有报道指出,某些氨基酸经氧化修饰后的质量会和其他氨基酸残基的质量相差细微,可能导致质谱鉴定中多肽的氨基酸组成误判^[28]。氨基酸残基的氧化修饰情况既有修饰基团数目的不同,又存在修饰位置的差异。此时,质谱仪是否能准确识别特征性多肽成为关键一环,本实验使用的拥有高分辨率的Orbitrap质量分析器(m/z 200: 一级质谱分辨率70000,二级质谱分辨率:17500)能有效解决这种情况^[15],如脯氨酸羟基化后的分子量(分子量:131.13)和亮氨酸或异亮氨酸残基(分子量:131.18)很接近,而这细微的质量差能被Orbitrap质量分析器准确分辨^[15]。如表3,2条氨基酸序列均为 $^{225}\text{VGAPGPAGAR}^{234}$,而氧化修饰的数目分别为0和1个的多肽(如图2)。理论上当多肽质谱峰的价态为+2时,每增加一个氧化修饰,多肽质谱峰就对应增加8 Da。而这

2条只相差一个氧化修饰的多肽的 m/z 分别为426.7376 $^{2+}$ 、434.7350 $^{2+}$,其质谱峰之间的实测值差距(7.9974 Da)恰好与理论差值对应。这也能更好地体现高分辨率质谱在明胶鉴定中的高效性。

不同剂型阿胶制品(阿胶糕、阿胶颗粒和阿胶口服液)在加工工艺和辅料添加上都大不相同,但仍有25条共有阿胶特征性多肽被稳定的检测并筛选出来(如表2)。这些阿胶共有特征性多肽能排除基质效应和复杂工艺等外界因素的干扰而被准确鉴定,对阿胶制品中阿胶的真实性检测具有重要意义。另外,在9种阿胶制品中均添加质量分数为1%的猪明胶和牛明胶,但不同阿胶制品中检测到的来自猪明胶和牛明胶的特征性多肽数量均不同(如表1),这可能是加工工艺和原辅料添加情况不同导致阿胶制品物质体系存在差异,进而影响外加明胶(牛明胶和猪明胶)与体系间的相互作用,使得牛/猪明胶在处理过程中的保留情况不同,因而HPLC-MS/MS检测特征性多肽的鉴定结果不同。总体而言,在明胶鉴定过程中,明胶制备工艺、明胶制品加工工艺、食品体系中明胶占比等情况均会影响目标明胶特征性多肽的检出效果。课题组前期研究发现,制备过程中的加热温度、时间、提取次数等工艺因素均会影响明胶特征性多肽的鉴定^[18-19],且混合体系中明胶占比(浓度)也将直接影响目标明胶特征性多肽在质谱试验中的识别和检测结果^[21]。此外,Yilmaz等^[23]报道显示同批次明胶在纯明胶体系和奶制品(酸奶/奶酪/冰淇淋)中检测到的特征性多肽也会有所不同。因此,本文选取了3种阿胶制品类型(9种阿胶制品)为实验对象,排除不同因素带来的鉴定干扰,筛选出共有的牛明胶和猪明胶特征性多肽,为HPLC-MS/MS检测阿胶制品是否掺入其他明胶提供判断依据。

3 结论

阿胶是滋补良品,其衍生出来的阿胶制品也深受广大消费者的喜爱。与此同时,阿胶掺假事件也让广大消费者对阿胶制品中明胶的来源存有疑虑。因此,本文以9种(3类)常见的阿胶制品为原料,按照质量分数1%的比例向其中分别添加典型明胶(牛明胶和猪明胶),酶解后采用HPLC-MS/MS鉴定阿胶、牛明胶和猪明胶的特征性多肽。经分析,在福牌阿胶糕、东阿桃花姬阿胶糕、同仁堂阿胶糕、驴胶补血颗粒、阿归养血颗粒、阿胶补血颗粒、阿胶补血口服液、阿胶益寿口服液和复方阿胶浆中分别鉴定出了不同数量的阿胶、牛明胶和猪明胶特征性多肽。在这9种不同阿胶制品中共有的阿胶、牛明胶和猪明胶的特征性多肽分别有25、3和14,这些共有特征性多肽能排除加工工艺和添加辅料等复杂条件的干扰而被稳定检测出,因此可作为阿胶制品中明胶来源鉴定的依据。基于本文的研究方法,后期可进一步开展更多阿胶制品(如阿胶枣、阿胶糖、阿胶粉等)中明

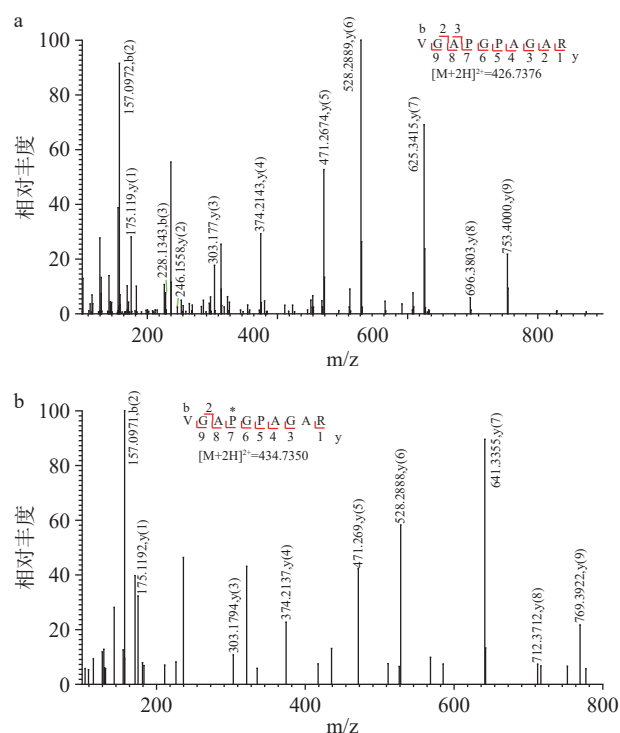


图2 猪明胶特征性多肽不同修饰水平的鉴定

Fig.2 Different modified characteristic peptides of porcine gelatin

注: a: 猪明胶特征性多肽 $^{225}\text{VGAPGPAGAR}^{234}$; b: 猪明胶特征性多肽 $^{225}\text{VGA*PGPAGAR}^{234}$ (*代表氧化修饰)。

胶来源的鉴定探索,为阿胶产品的质量保障提供技术支撑。

参考文献

- [1] 张金聚,张英,孟江,等. 阿胶历史沿革考[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(10): 2464–2472. [ZHANG J J, ZHANG Y, MENG J, et al. A research on the history of Ejiao[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2020, 45(10): 2464–2472.]
- [2] 王子凤. 中药阿胶临床应用分析及药理作用研究[J]. 基层医学论坛, 2020, 24(29): 4248–4249. [WANG Z F. Analysis of clinical application and pharmacological action of traditional chinese medicine Ejiao[J]. Primary Medicine Forum, 2020, 24(29): 4248–4249.]
- [3] 田洪芸,吴鸿敏,毕婷婷,等. 阿胶糕中脂肪含量测定方法研究[J]. 食品科技, 2020, 45(4): 282–285. [TIAN H Y, WU H M, BI T T, et al. Study on determination method of fat content in Ejiao cake[J]. Food Technology, 2020, 45(4): 282–285.]
- [4] 王素利,张元丽,张宇. 胶枣补血颗粒治疗肾性贫血血虚证的临床观察[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(1): 401–403. [WANG S L, ZHANG Y L, ZHANG Y. Clinical observation of Jiaozao buxue granules in treating renal anemia with blood deficiency syndrome[J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2019, 34(1): 401–403.]
- [5] 闵永峰. 阿胶颗粒对原发性肝癌 TACE 治疗患者肠道微生态和机体炎症的影响[D]. 济南: 济南大学, 2019. [MIN Y F. Effects of Ejiao granules on intestinal microecology and body inflammation in patients with primary liver cancer treated with TACE[D]. Jinan: Jinan University, 2019.]
- [6] 徐琳. 当归及其补血口服液研究[D]. 成都: 西南交通大学, 2015. [XU L. Study on *Angelica sinensis* and its blood-enriching oral liquid[D]. Chengdu: Southwest Jiaotong University, 2015.]
- [7] 韩彦彬,彭亮,赵鹏,等. 云亭牌阿胶口服液改善大鼠营养性贫血的效果评价[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(8): 1765–1766. [HAN Y B, PENG L, ZHAO P, et al. Evaluation of the effect of Yunting brand Ejiao oral liquid in improving nutritional anemia in rats[J]. Chinese Health Laboratory Technology, 2009, 19(8): 1765–1766.]
- [8] 李志,陈壁锋,黄俊明,等. 阿胶口服液对小鼠细胞免疫和体液免疫功能的影响[J]. 中国卫生检验杂志, 2008(7): 1426–1427. [LI X, CHEN B F, HUANG J M, et al. Effects of Ejiao oral liquid on cellular immunity and humoral immunity in mice[J]. Chinese Health Laboratory Technology, 2008(7): 1426–1427.]
- [9] 邓素坚,廖雪珍,黄桂英. 首乌阿胶口服液补血、补肾作用的实验研究[J]. 广东药学院学报, 2006(3): 294–296. [DENG S J, LIAO X Z, HUANG G Y. Experimental study on the functions of Shouwu Ejiao oral liquid to invigorate blood and kidney[J]. Journal of Guangdong Pharmaceutical University, 2006(3): 294–296.]
- [10] 陈思秀,张馨方,刘玟妍,等. 阿胶中动物源性 DNA 提取方法的改进及驴源性成分鉴定[J]. 中国药学杂志, 2019, 54(22): 1840–1845. [CHEN S X, ZHANG X F, LIU W Y, et al. Improvement of extraction method of animal-derived DNA in donkey-hide gelatin and identification of donkey-derived components[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2019, 54(22): 1840–1845.]
- [11] 那丽丹. 代谢组学技术在阿胶原料及其产品质量控制中的应用初探[D]. 太原: 山西大学, 2015. [NA L D. Application of metabolomics technology in quality control of Ejiao raw materials and products[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2015.]
- [12] 沙小梅,胡姿姿,涂宗财,等. ~(18)O 标记联合高效液相色谱-高分辨率质谱技术定量测定阿胶中的明胶[J]. 食品科学, 2018, 39(12): 288–294. [SHA X M, HU Z Z, TU Z C, et al. Quantification of gelatin in donkey-hide gelatin by oxygen-18 labelling and high performance liquid chromatography linear ion trap/orbitrap high resolution mass spectrometry[J]. Food Science, 2018, 39(12): 288–294.]
- [13] 乔琰. 动物皮中脂溶性成分的指纹图谱研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2015. [QIAO Y. Fingerprint study of fat-soluble components in animal skin[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2015.]
- [14] 规范阿胶市场从“健字号”开始[N]. 中国食品报, 2019-07-05(005). [Regulating the Ejiao market starts with the "Jianzihao" [N]. China Food News, 2019-07-05(005).]
- [15] KLEINNIJENHUIS A J, VAN HOLTHOON F L, HERRE-GODS G. Validation and theoretical justification of an LC-MS method for the animal species specific detection of gelatin[J]. Food Chemistry, 2018, 243: 461–467.
- [16] 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. [JIAO Y, WANG B, ZHOU Q Q, et al. Detection of horsepi source components in Ejiao by ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2019, 39(5): 864–869.]
- [17] 陈鸿玉,李文莉,李劲平,等. 高效液相色谱-质谱联用技术测定妇科止带片中阿胶[J]. 海峡药学, 2017, 29(8): 32–35. [CHEN H Y, LI W L, LI J P, et al. Determination of Ejiao in Fuke Zhidai tablets by HPLC-MS[J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2017, 29(8): 32–35.]
- [18] 沙小梅,张丽君,蒋文丽,等. 高效液相色谱-高分辨率质谱联用技术鉴定阿胶块中不同胶类的特征性多肽[J]. 食品工业科技, 2022, 43(4): 97–104. [SHA X M, ZHANG L J, JIANG W L, et al. Identification of characteristic peptides of different gelatins in donkey-hide gelatin lump by high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(4): 97–104.]
- [19] SHA X M, HU Z Z, YE Y H, et al. Effect of extraction temperature on the gelling properties and identification of porcine gelatin[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 92: 163–172.
- [20] ZHANG Q T, TU Z C, WANG H, et al. Improved glycation after ultrasonic pretreatment revealed by high-performance liquid chromatography-linear ion trap/orbitrap high-resolution mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(12): 2522–2530.
- [21] SHA X M, ZHANG L J, TU Z C, et al. The identification of three mammalian gelatins by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry[J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 89: 74–86.
- [22] SCHRIEBER R, GAREIS H. Gelatine handbook: Theory and industrial practice[M]. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007.
- [23] YILMAZ M T, KESMEN Z, BAYKAL B, et al. A novel method to differentiate bovine and porcine gelatins in food products: Nano UPLC-ESI-Q-TOF-MS E based data independent acquisition technique to detect marker peptides in gelatin[J]. Food Chemistry, 2019, 281: 123181.

2013, 141(3): 2450–2458.

[24] LIU R, HUANG Y, XU H K, et al. A strategy for identifying species-specific peptide biomarkers in deer-hide gelatin using untargeted and targeted mass spectrometry approaches[J]. [Analytica Chimica Acta](#), 2019, 1092: 32–41.

[25] DEMIRHAN Y, ULCA P, SENYUVA H Z. Detection of porcine DNA in gelatine and gelatine-containing processed food products-Halal/Kosher authentication[J]. [Meat Sci](#), 2012, 90(3): 686–689.

[26] 孙坤, 杨帆, 孔英俊, 等. 基于生物质谱的胶原蛋白定量检测方法[J]. 生物工程学报, 2015, 31(11): 1660–1668. [SUN K,

YANG Y, KONG Y J, et al. Collagen quantitation by detection of marker peptides with HPLC-MS[J]. [Chinese Journal of Biotechnology](#), 2015, 31(11): 1660–1668.]

[27] GRUNDY H H, REECE P, BUCKLEY M, et al. A mass spectrometry method for the determination of the species of origin of gelatine in foods and pharmaceutical products[J]. [Food Chemistry](#), 2016, 190: 276–284.

[28] SU S N K, HYEON G L, HYUNSOOK K. Development and comparison of a porcine gelatin detection system targeting mitochondrial markers for Halal authentication[J]. [LWT-Food Science and Technology](#), 2018, 97: 697–702.