

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. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060180

SHA Xiaomei, ZHANG Lijun, JIANG Wenli, 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. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060180

· 研究与探讨 ·

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

沙小梅^{1,2}, 张丽君¹, 蒋文丽¹, 王光耀¹, 谢作桦², 黄国太³, 涂宗财^{1,4,*}

(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. 江西德上医药研究院有限公司, 江西樟树 331208;

4. 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: 为研究阿胶块中不同明胶的来源, 本文以 4 种品牌的阿胶块为原料, 向其中分别加入低含量 (1 mg/mL) 的牛明胶和猪明胶, 采用高效液相色谱-质谱联用技术 (high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS/MS) 分别鉴定阿胶、牛明胶和猪明胶的特征性多肽。结果表明, 在 4 种阿胶块中准确检测出阿胶、牛明胶和猪明胶的共有特征性多肽数量分别为 18、3 和 5 个, 其中来自 α_1 链的特征性多肽有 10、1 和 1 个, 来自 α_2 链的则有 8、2 和 4 个; 同时, 有羟基化修饰脯氨酸的共有特征性多肽数量分别为 15、2 和 4 个, 不包含任何修饰基团的特征性多肽对应则有 3、1 和 1 个。这些共有的特征性多肽可为 HPLC-MS/MS 溯源鉴定阿胶块中的明胶源提供依据, 对阿胶块产品的质量保障具有一定的参考意义。

关键词: 阿胶, 高效液相色谱-质谱联用技术, 溯源鉴定, 牛明胶, 猪明胶

中图分类号: TS201.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)04-0097-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060180



本文网刊:

Identification of Characteristic Peptides of Different Gelatins in Donkey-hide Gelatin Lump by High Performance Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry

SHA Xiaomei^{1,2}, ZHANG Lijun¹, JIANG Wenli¹, WANG Guangyao¹, XIE Zuohua²,
HUANG Guotai³, TU Zongcai^{1,4,*}

(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. Jiangxi Deshang Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Zhangshu 331208, China;

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

Abstract: To study the source of different gelatins of donkey-hide gelatin lumps, four kinds of donkey-hide gelatin lumps were added with low content (1 mg/mL) of bovine gelatin and porcine gelatin respectively. High-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS/MS) were chosen to identify the characteristic peptides of donkey-hide gelatin, bovine gelatin and porcine gelatin. The results showed that 18, 3 and 5 common characteristic peptides were accurately detected in the four kinds of donkey-hide gelatin lump for donkey-hide gelatin, bovine gelatin and porcine

收稿日期: 2021-06-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31860428, 32160576); 财政部和农业农村部; 国家现代农业产业技术体系资助 (CARS-45)。

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

* 通信作者: 涂宗财 (1965-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 绿色食物资源高值化利用, E-mail: 004756@jxnu.edu.cn。

gelatin, respectively, with 10, 1 and 1 from the α_1 chain and 8, 2 and 4 from the α_2 chain. Meanwhile, the number of common characteristic peptides with hydroxylated modifications was 15, 2 and 4 respectively, while those without any modification groups were 3, 1 and 1. These common characteristic peptides would provide a basis for the HPLC-MS/MS traceable identification of the gelatin source in donkey-hide gelatin lump, which is of reference significance for the quality assurance of donkey-hide gelatin lump products.

Key words: donkey-hide gelatin; high-performance liquid chromatography-mass spectrometry; traceability identification; bovine gelatin; porcine gelatin

阿胶是驴皮胶原蛋白适度水解断裂而得到的产物,因其具有补血、抗疲劳、增强免疫力等保健功效,受到广大消费者的喜爱,并与人参、鹿茸并称为三大最具价值的传统中药材^[1-2]。近年来,随着人们生活水平的提高以及保健意识的增强,人们对阿胶的购买力明显增长,阿胶市场规模逐年递增。据统计数据显示,从 2009 到 2019 年,阿胶市场规模复合年增长率达到 18.1%,并且,《山东省医养健康产业发展规划(2018~2022 年)》中明确提出做大阿胶市场,阿胶市场规模有望进一步扩大^[3-4]。然而,驴皮资源紧缺造成阿胶价格上涨,在利益的驱使下,不法商家向阿胶中大量掺入其他相对低价的牛皮明胶或猪皮明胶,制成的掺假阿胶阻碍了阿胶市场的健康发展,引发了消费者的购买担忧^[5-7]。因此,阿胶产品中胶类来源的鉴别研究对规范阿胶市场秩序具有重要意义。

目前,国内外已公开报道了多种用于哺乳动物明胶(尤其是猪明胶和牛明胶)鉴定的方法,包括红外光谱法^[8]、电泳技术^[9]、聚合酶链式反应技术^[10-11]、酶联免疫吸附测定^[12-13]、高效液相色谱-质谱联用技术(high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS/MS)^[14-15]等。相比之下,HPLC-MS/MS 技术是被认为准确度最高的明胶鉴定方法,受到国内外研究者的认可^[16-17]。同时,HPLC-MS/MS 也被用于阿胶的鉴定中,如 Cheng 等^[18]运用 HPLC-MS/MS 开展了阿胶、牛皮明胶、猪皮明胶、龟甲胶和鹿角胶的鉴定研究,在每种明胶中鉴定出 1 个特征性多肽;焦阳等^[19]利用 HPLC-MS/MS 确定了 1 个区别于阿胶的马皮源特征性多肽。本课题组在前期以阿胶、猪明胶和牛明胶为研究对象,运用 HPLC-MS/MS 确定了不同比例混合明胶中低含量目标明胶的多个特征性多肽^[20]。目前市面上的阿胶产品中以阿胶块占比最大^[21]。然而,目前关于阿胶块产品中的阿胶和其他来源明胶的溯源研究少有报道,这值得深入研究和探索。

基于阿胶市场的快速发展和阿胶的溯源研究现状,本文以目前阿胶市场占比最大的阿胶块为研究对象,向其中分别加入在食用明胶市场中占比最大的猪明胶和牛明胶,采用 HPLC-MS/MS 分别鉴定阿胶块中阿胶、猪明胶和牛明胶的特征性多肽,为阿胶块产品的准确鉴定提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

4 种阿胶块产品 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、北京同仁堂科技发展股份有限公司和九芝堂股份有限公司;牛皮明胶、猪皮明胶 美国 sigma 公司;胰蛋白酶(酶活力:19385 U/mg) 美国 Promega Corporation 公司;其他试剂 均为分析纯。

LGJ-1D-80 型冷冻干燥机 北京亚泰科隆仪器技术有限公司;EASY-nLC™ 1000 色谱系统、Q-Exactive 质谱仪 美国 Thermo Fisher Scientific 公司;RP-C₁₈ 液相色谱柱(0.15 mm×150 mm, 5 μ m) 美国 Column Technology 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 阿胶块样品的处理 用去离子水将 4 种阿胶块产品在 50 $^{\circ}$ C 水浴锅中分别溶解制成 100 mg/mL 的阿胶溶液,同时分别向其中加入低含量的牛明胶和猪明胶,使得牛明胶和猪明胶在整个溶液体系中的质量浓度均为 1 mg/mL,搅拌均匀制成阿胶-牛明胶-猪明胶的混合溶液。置于离心机中以 6000 $\times$ g 的速度离心 25 min,所得上清液进一步通过 0.45 μ m 的过滤器处理,将得到的滤液冻干,备用。

1.2.2 样品的酶解 样品参照课题组前期的方法进行酶解^[22]。将冻干后的样品溶解于 SDT 缓冲液(4 mg/mL 十二烷基硫酸钠、100 mmol/L 二硫苏糖醇、150 mmol/L pH8.0 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)溶液)并制成质量浓度为 1 μ g/ μ L 的溶液,于沸水中加热 3 min 后在离心机中 12000 $\times$ g 离心 15 min。将上清液置于超滤离心管(截留分子质量为 10 kDa)中,加入 200 μ L 尿素裂解液(8 mol/L 尿素,150 mmol/L pH8.0 Tris-HCl 溶液)后以 14000 $\times$ g 离心 15 min。往浓缩物中加入 200 μ L 尿素裂解液后再次离心。然后,加入 100 μ L 50 mmol/L 的碘乙酰胺溶液,于暗室放置 30 min 后 14000 $\times$ g 离心 15 min。之后,加入 100 μ L 尿素裂解液,14000 $\times$ g 离心 15 min,重复此操作 2 次。加入 100 μ L 的 25 mmol/L NH₄HCO₃ 溶液并 14000 $\times$ g 离心 30 min,重复操作 2 次。最后,在浓缩物中加入含 2 μ g 胰蛋白酶的 40 μ L 25 mmol/L NH₄HCO₃ 溶液,37 $^{\circ}$ C 放置反应 20 h 后 14000 $\times$ g 离心 20 min 收集滤液,即得到明胶多肽溶液。

1.2.3 高效液相色谱-质谱检测 混合明胶酶解液运用 Easy nLC-Orbitrap Fusion Tribrid 质谱仪进行检测。流动相 A 为含有体积分数 0.1% 甲酸的水溶液,流动相 B 为体积分数 84% 的乙腈溶液(含有体积分数 0.1% 的甲酸)。RP-C₁₈ 色谱柱以 95% 的 A 液进

行平衡, 样品由自动进样器上样到 Zorbax 300SB-C₁₈ peptide traps, 经色谱柱以 250 nL/min 的流速洗脱 60 min, 流动相 A 线性梯度变化为流动相 B。采用数据依赖采集模式动态收集丰度最高的 10 个母离子(m/z 范围为 300~1800)进行高能碰撞解离(high energy collision dissociation, HCD)模式碎裂。动态排除时间为 20 s, 归一化碰撞能量为 27 eV。

1.3 数据处理

采用 MASCOT 软件(Matrix Science, London, UK; version 2.2)匹配分析所获得的质谱图, 数据库设置为目标胶原蛋白(驴皮、牛皮和猪皮胶原蛋白)数据库。检索参数包括: 半胱氨酸碘乙酰胺化(C)为固定修饰; 氧化(M、P、K)为可能性修饰; 最大漏切位点数为 2; 一级质谱错误率为 $\pm 20 \times 10^{-6}$; 二级质谱错误率为 ± 0.1 Da。当 Mascot 分数大于 40 时, 多肽峰被认定为阳性鉴定或准确度极高($P < 0.05$)^[23]。阿胶、牛明胶和猪明胶特征性多肽的比对分析是依据课题组前期建立的 3 种胶原蛋白理论特征性多肽数据库开展的^[20]。

2 结果与分析

2.1 阿胶块中阿胶、牛明胶和猪明胶的特征性多肽差异性分析

本课题组前期研究了不同加热温度对猪皮明胶鉴定效果的影响, 结果发现不同温度下制备的猪皮明胶特征性多肽有所不同^[22]。由于阿胶与其他来源的明胶类似, 在不同生产厂家, 阿胶块的生产工艺和参数可能会略有不同, 其分子链的断裂程度会受到多种因素(如加热温度、提取时间、酸碱性等)的影响^[24], 进而可能会对阿胶溯源产生一定影响。因此, 从广受消费者青睐的阿胶块中找出共有的阿胶特征性多肽对于阿胶块产品的溯源鉴定研究显得十分必要。故选取了 4 种知名品牌的阿胶块(同仁堂阿胶块、福牌阿胶块、东阿阿胶块和九芝堂阿胶块)分别鉴定阿胶特征性多肽, 并通过韦恩图分析不同品牌阿胶块中阿胶特征性多肽的差异性, 并确定 4 种阿胶块中共有的阿胶特征性多肽。由图 1a 可知, 同仁堂阿胶块、福牌阿胶块、东阿阿胶块和九芝堂阿胶块经 HPLC-MS/MS 并匹配驴皮多肽数据库分别鉴定出 31、30、36 和 37 个阿胶特征性多肽, 其中 4 种品牌的阿胶块共有 18 个特征性多肽, 对阿胶块产品中阿胶成分的溯源鉴定有十分重要的意义。除此之外, 同仁堂阿胶块、福牌阿胶块、东阿阿胶块和九芝堂阿胶块分别被鉴定出 13、12、18 和 19 个非共有阿胶特征性多肽, 这些多肽的质谱峰只在 1 种、2 种或者 3 种阿胶块的质谱图中被检出, 因而不适宜用于阿胶块的溯源鉴定。

除了鉴定阿胶块中的阿胶特征性多肽, 若能同时找出其他来源明胶的特征性多肽, 将有利于阿胶块产品中掺假明胶的鉴别分析。因此, 本文以 4 种阿胶块为原料, 向其中加入 1 mg/mL 的牛皮明胶和猪

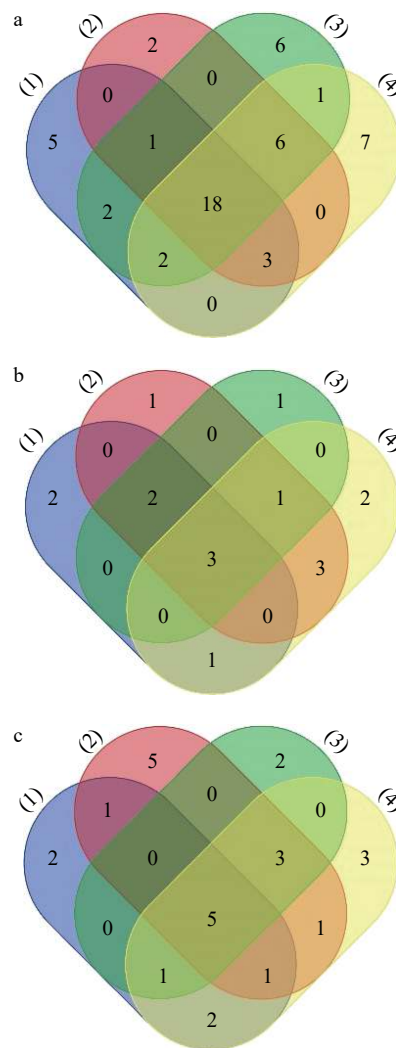


图 1 阿胶块中阿胶、牛明胶和猪明胶特征性多肽组成的差异性分析

Fig.1 Differential analysis of the characteristic peptides composition of donkey-hide gelatin, bovine gelatin and porcine gelatin in donkey-hide gelatin lumps

注: (1): 同仁堂阿胶块; (2): 福牌阿胶块; (3): 东阿阿胶块; (4): 九芝堂阿胶块; a: 阿胶块中阿胶的特征性多肽组成的差异性分析; b: 阿胶块中牛明胶的特征性多肽组成的差异性分析; c: 阿胶块中猪明胶的特征性多肽组成的差异性分析。

皮明胶, 通过 HPLC-MS/MS 鉴定牛明胶和猪明胶的特征性多肽。由图 1b 可知, 加入牛明胶后, 经过过滤、离心、酶解等多种前处理工序后, 与牛皮多肽数据库进行匹配, 同仁堂阿胶块、福牌阿胶块、东阿阿胶块和九芝堂阿胶块中分别鉴定出 8、10、7 和 10 个牛明胶特征性多肽, 其中有 3 个特征性多肽均能在 4 种阿胶块中被检出, 可作为阿胶块中追溯是否掺有牛明胶的依据。然而, 4 种品牌的阿胶块中还分别有 5、7、4 和 7 个非共有的牛明胶特征性多肽被检出, 这些特征性多肽不能同时在 4 种阿胶块中被鉴定出来可能是在阿胶块前处理的过程中丢失或者低含量难以被质谱仪检出。由图 1c 可知, 加入猪明胶后, 所得多肽与猪皮多肽数据库进行匹配, 同仁堂阿胶块、福牌阿胶块、东阿阿胶块和九芝堂阿胶块中分别检测出 12、16、11 和 16 个猪明胶特征性

多肽,其中有 5 个特征性多肽在 4 种阿胶块中均能被检出,因此可作为阿胶块中追溯是否掺有猪明胶的依据。相应地,4 种阿胶块中分别有 7、11、6 和 11 个非共有的猪明胶特征性多肽被检出。在质谱检测中,氨基酸序列和修饰情况会影响多肽的检出效果^[25-26],多肽的含量亦会影响其在质谱图中的信号强度^[20]。此外,检测实验前处理过程同样可能对多肽产生影响,进而干扰其质谱检测。上述因素均可能导致多肽只能在部分阿胶块产品中被检出,这些不能被稳定检出的特征性多肽用于阿胶块中猪明胶的溯源具有较大风险,可能会引起“假阴性”结果的出现。

实验结果表明,当牛明胶和猪明胶在阿胶块中占比低时,依然可以在阿胶块中稳定地检测出 3 个牛明胶特征性多肽和 5 个猪明胶特征性多肽。一般情况下,在质谱峰中同时找到 1 种蛋白质的 2 个多肽即可证明该蛋白质的存在^[27]。因此,上述结果说明 HPLC-MS/MS 能有效鉴别阿胶块中低含量的牛明胶和猪明胶。

2.2 阿胶块中阿胶的共有特征性多肽

研究不同品牌阿胶块中阿胶的共有特征性多肽,有利于减少不同厂家制备工艺的差异对阿胶鉴定效果带来的影响,这对阿胶块的溯源鉴定十分重要。结合图 1a 和表 1 可知,4 种阿胶块中阿胶的共有特征性多肽数目为 18 个,其中 10 个来自于 α_1 链,8 个来自于 α_2 链。值得说明的是,在这些共有特征性多肽中,有 3 个多肽是不含修饰基团的,分别是来自 α_1 链的(R)¹⁰⁶⁶GEAGPAGPAGPIGPVGAR¹⁰⁸³(G)和

(R)⁹⁹⁴GPPGPVGPGLAGPPGESGR¹⁰¹³(E)以及来自于 α_2 链的(R)¹⁰⁵²GPAGPTGPVGK¹⁰⁶²(D)。胶原蛋白含有大量的翻译后修饰,使得明胶肽段的鉴定更为复杂,因此,在溯源鉴定中不带修饰基团的特征性多肽往往更受青睐,其在裂解过程中产生的碎片离子更容易被识别和匹配,能有效降低质谱峰鉴定过程中的难度,提高多肽鉴定的准确度^[28-29]。

尽管翻译后修饰大大增加了特征性多肽的鉴定难度,但由于其在特征性多肽总数中所占比例很大,特征性多肽修饰情况(尤其是脯氨酸(Pro)残基上的羟基化修饰)的鉴定不容忽视。如表 1 所示,4 种品牌阿胶中有 15 个共有特征性多肽(8 个来自于 α_1 链,7 个来自于 α_2 链)被鉴定出含有羟脯氨酸,在特征性多肽总数中占比 83.3%。而且,脯氨酸残基的羟基化修饰情况较为复杂,既有修饰基团的数目不同,也有羟基化修饰位置的不同。例如,表 1 中有 5 个特征性多肽均来源于 α_1 链的⁹⁹⁴GPPGPVGPGLAGPPGESGR¹⁰¹³,m/z 分别为 900.9510²⁺、892.9526²⁺、892.9533²⁺、884.9557²⁺和 876.9591²⁺,包含的羟脯氨酸残基数量分别为 3、2、2、1 和 0 个。由于多肽质谱峰的价态为+2,所以每增加 1 个羟基化修饰意味着一级质谱峰值增加 8 Da。另外,m/z 为 892.9526²⁺和 892.9533²⁺的特征性多肽虽然都含有 2 个被羟基化的脯氨酸残基,但其修饰基团所处的位置是不同,大大增加了阿胶溯源的难度。有报道指出,脯氨酸残基的羟基化修饰引起的质量改变可能和一些氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸)残基的质量差异较为接近,将对

表 1 阿胶的共有特征性多肽

Table 1 Common characteristic peptides of donkey-hide gelatin

阿胶的特征多肽序列	m/z	相对分子质量		
		实测值	理论值	误差($\times 10^{-6}$)
α_1 : (K) ⁸³⁵ GDAG*PPGPAGPAGPPG*PIGSVGA*PG*PK ⁸⁶¹ (G)	1148.5667 ²⁺	2295.1188	2295.1132	2.45
α_1 : (K) ⁸³⁵ GDAG*PPGPAGPAGPPGPIGSVGA*PG*PK ⁸⁶¹ (G)	1140.5707 ²⁺	2279.1268	2279.1183	3.75
α_1 : (K) ⁸³⁵ GDAGPPGPAGPAGPPGPIGSVGA*PGPK ⁸⁶¹ (G)	1124.5759 ²⁺	2247.1372	2247.1284	3.91
α_1 : (R) ¹⁰⁶⁶ GEAGPAGPAGPIGPVGAR ¹⁰⁸³ (G)	765.9082 ²⁺	1529.8018	1529.7950	4.43
α_1 : (R) ⁴⁷² GE*PGPTGL*PGP*PGER ⁴⁸⁶ (G)	733.3516 ²⁺	1464.6886	1464.6845	2.81
α_1 : (R) ⁹⁹⁴ G*PPGPVGPGLAG*P*PGESGR ¹⁰¹³ (E)	900.9510 ²⁺	1799.8874	1799.8802	3.98
α_1 : (R) ⁹⁹⁴ G*PPGPVGPGLAG*P*PGESGR ¹⁰¹³ (E)	892.9526 ²⁺	1783.8906	1783.8853	2.96
α_1 : (R) ⁹⁹⁴ GPPGPVGP*PGLAG*PPGESGR ¹⁰¹³ (E)	892.9533 ²⁺	1783.8920	1783.8853	3.74
α_1 : (R) ⁹⁹⁴ GPPGPVGP*PGLAGPPGESGR ¹⁰¹³ (E)	884.9557 ²⁺	1767.8968	1767.8904	3.62
α_1 : (R) ⁹⁹⁴ GPPGPVGPGLAGPPGESGR ¹⁰¹³ (E)	876.9591 ²⁺	1751.9036	1751.8955	4.63
α_2 : (R) ⁸²⁹ AGETGASGP*PGFAGEK ⁸⁴⁴ (G)	724.8384 ²⁺	1447.6622	1447.6579	2.96
α_2 : (R) ⁷⁷⁶ GDGGP*PGVTGF*PGAAGR ⁷⁹² (T)	751.3571 ²⁺	1500.6996	1500.6958	2.57
α_2 : (R) ⁷⁷⁶ GDGGPPGVTGF*PGAAGR ⁷⁹² (T)	743.3608 ²⁺	1484.7070	1484.7008	4.16
α_2 : (R) ⁹⁷⁷ GE*PGPVGSVGPVGA VGPR ⁹⁹⁴ (G)	802.9266 ²⁺	1603.8386	1603.8318	4.21
α_2 : (R) ⁹⁷⁷ GE*PGPVGSVGPVGA VGPR ⁹⁹⁴ (G)	802.9270 ²⁺	1603.8394	1603.8318	4.71
α_2 : (R) ⁸⁸¹ GL*PGVAGSLGE*PGPLGIAGP*PGAR ⁹⁰⁴ (G)	1073.0730 ²⁺	2144.1314	2144.1226	4.11
α_2 : (R) ¹⁰⁵² GPAGPTGPVGK ¹⁰⁶² (D)	469.2602 ²⁺	936.5058	936.5029	3.12
α_2 : (R) ⁷⁹³ TG*P*PGPSGISGPPG*P*PGAAGK ⁸¹³ (E)	910.4481 ²⁺	1818.8816	1818.8748	3.73

注: *P为羟基化的脯氨酸;表2~表3同。

鉴定造成较大的干扰^[29]。此时, 高分辨率质谱仪检测是一种有效增强特征性多肽鉴定准确度的手段。Kleinnijenhuis 等^[17]报道显示, Orbitrap 质量分析器提供的高分辨率能有效区分羟脯氨酸和亮氨酸、异亮氨酸之间的细微差别。在本文中, 采用的 Orbitrap 质量分析器在一级质谱峰 m/z 200 时分辨率能达到 70000, 在 HCD 二级质谱图中 m/z 200 时

分辨率能达到 17500, 为准确鉴定阿胶、牛明胶和猪明胶的特征性多肽提供了有利保障。

对于不同羟基化修饰水平, 以 5 条来自阿胶共有特征性多肽片段⁹⁹⁴GPPGPVGPPLAGPPGESGR¹⁰¹³为例, 它们的相对分子质量的实测值与理论值匹配度良好, 误差均小于 5×10^{-6} 。5 条阿胶共有特征性多肽二级质谱如图 2 所示。对于有羟基化修饰的

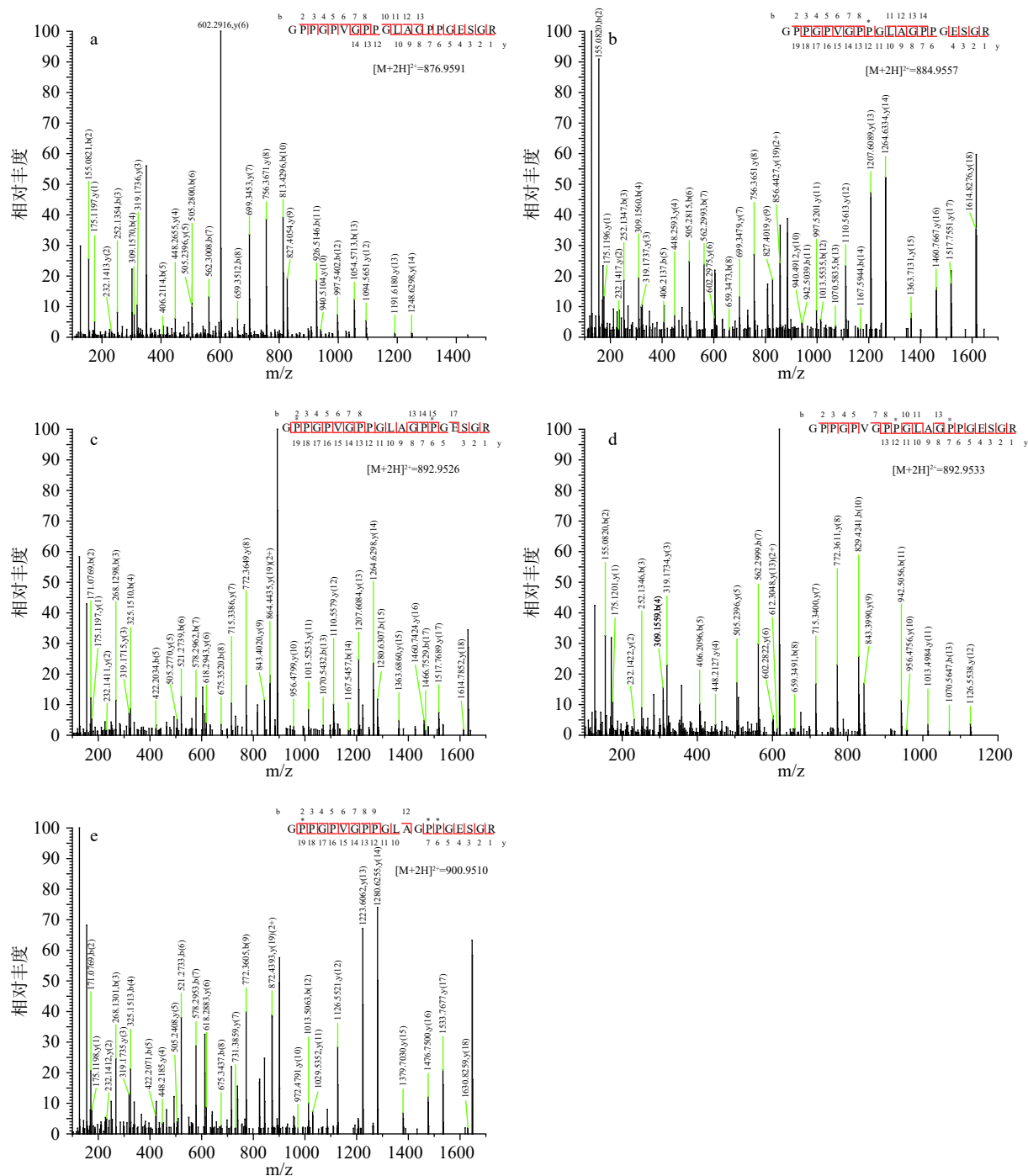


图 2 不同羟基化修饰水平的阿胶特征性多肽的质谱鉴定

Fig.2 Mass spectrometric identification of characteristic peptides of gelatin with different hydroxylated modification levels

注: a: 阿胶 α_1 链中的特征性多肽(R)⁹⁹⁴GPPGPVGPPLAGPPGESGR¹⁰¹³(E)(无修饰); b: 阿胶 α_1 链中的特征性多肽(R)⁹⁹⁴GPPGPVGP*PGLAGPPGESGR¹⁰¹³(E)(Pro1002 被羟基化); c: 阿胶 α_1 链中的特征性多肽(R)⁹⁹⁴G*PPGPVGPPLAG*PPGESGR¹⁰¹³(E)(Pro995, Pro1008 被羟基化); d: 阿胶 α_1 链中的特征性多肽(R)⁹⁹⁴GPPGPVGP*PGLAG*PPGESGR¹⁰¹³(E)(Pro1002, Pro1007 被羟基化); e: 阿胶 α_1 链中的特征性多肽(R)⁹⁹⁴G*PPGPVGPPLAG*P*PPGESGR¹⁰¹³(E)(Pro995, Pro1007 和 Pro1008 被羟基化)。

位点, m/z 为 884.9557²⁺ 峰值的肽段, 通过 y12-y11 可证实 Pro1002 被羟基化(图 2b); m/z 为 892.9526²⁺ 的肽段, Pro995 和 Pro1008 分别可通过 y19-y18 以及 y6-y5 被证实为羟脯氨酸残基(图 2c); m/z 为 892.9533²⁺ 的肽段与 m/z 为 892.9526²⁺ 的肽段具有相同的羟基化修饰数量, 但有不同的羟基化修饰位置, 同理, y12-y11 与 y7-y6 分别准确地证实了 Pro1002 和 Pro1007 处的羟基化修饰(图 2d)。对于具有多个羟基化修饰位点的肽段, m/z 为 900.9510²⁺ 峰值的肽段, y19-y18、y7-y6 以及 y6-y5 准确证实了 Pro995、Pro1007 和 Pro1008 被羟基化的情况(图 2e)。这说明 HCD 碎裂生成的 MS/MS 系列 y 离子和 b 离子能够准确证实这 5 条特征性多肽具有相同的氨基酸序列以及不同的羟基化修饰水平。

2.3 阿胶块中牛明胶的共有特征性多肽

当阿胶中掺入了牛明胶时, 在质谱图中将出现来源于牛明胶肽段的质谱峰。若添加量较低, 使用高分辨质谱仪则能有效提高多肽的检出率和准确度。阿胶块中加入低含量的牛明胶, 经过 HPLC-MS/MS 的检测, 同仁堂阿胶块、福牌阿胶块、东阿阿胶块和九芝堂阿胶块中分别鉴定出 8、10、7 和 10 个牛明胶特征性多肽, 其中包含 3 个牛明胶的共有特征性多肽。如表 2 所示, 特征性多肽序列和修饰情况的判别均来源于一级质谱图和二级质谱图的共同检验, 其中, 1 个共有特征性多肽来自 α_1 链, 2 个共有特征性多肽则源自 α_2 链, 所有质谱峰的误差值均 $<5 \times 10^{-6}$, 说明这 3 个共有特征性多肽鉴定的准确度高, 可用于阿胶块产品中低含量牛明胶的鉴定分析。如上所述, 未经修饰的多肽片段在明胶鉴别中备受关注。由表 2 可知, 在牛明胶的 3 个共有特征性多肽中有 1 个源自 α_1 链的特征性多肽不包含任何修饰情况, 其序列为 ¹⁰⁶⁶GETGPAGPAGPIGPVGAR¹⁰⁸³, m/z 为

780.9135²⁺。这个特征性多肽在文献中已多次被报道在牛明胶中检出, 如 Kleinnijenhuis 等^[17] 在猪明胶中掺入低含量的牛明胶, 成功检测出此特征性多肽并用于定量研究; Yilmaz 等^[28] 将牛明胶掺入三种乳制品(酸奶、奶酪和冰淇淋)中, 利用超高效液相色谱-质谱联用技术检出了 35 条牛明胶特征性多肽, 这条多肽包含其中; Grundy 等^[30] 报道了 14 条牛明胶特征性多肽, 其中含有这条特征多肽; 课题组前期在纯的牛明胶以及不同比例的牛明胶、猪明胶和阿胶的混合体系中, 以及 ¹⁸O 标记定量检测猪明胶和牛明胶的实验中 also 检出了此特征性多肽^[20,31], 表明其用于牛明胶的溯源鉴定中具有较高的稳定性。

2.4 阿胶块中猪明胶的共有特征性多肽

猪明胶是工业领域使用最多的食用明胶, 同时在阿胶产品中也多次被曝光掺入了猪明胶^[32-33]。因而, 本文进一步研究了阿胶块中低含量猪明胶的特征性多肽。结合图 1c 和表 3 可知, 同仁堂阿胶块、福牌阿胶块、东阿阿胶块和九芝堂阿胶块中鉴定出的猪明胶特征性多肽比牛明胶特征性多肽数量更多, 分别为 12、16、11 和 16 个, 其中 5 个为阿胶块中猪明胶的共有特征性多肽(1 个共有特征性多肽是来自 α_1 链, 4 个共有特征性多肽则源自 α_2 链), 其各个特征性多肽的误差值均 $<5 \times 10^{-6}$, 且均经过一、二级质谱的准确判定, 其可信度高, 可用于阿胶块产品中低含量猪明胶的鉴定分析。在上述 5 个猪明胶的共有特征性多肽中, 有 1 个源自 α_1 链的特征性多肽不包含任何修饰情况, 其序列为 ¹⁰⁵²GETGPAGPAGPVG PVGAR¹⁰⁶⁹, m/z 为 773.9060²⁺。同样, 此猪明胶特征性多肽多次被报道在纯明胶或混合明胶中被检出, 如 Yilmaz 等^[28] 在乳制品中掺入猪明胶, 结果检出了 54 条猪明胶特征性多肽, 其中包含这条特征性多肽; Grundy 等^[30] 报道的 5 条猪明胶特征性多肽中亦

表 2 牛明胶的共有特征性多肽

Table 2 Common characteristic peptides of bovine gelatin

牛明胶的特征多肽序列	m/z	相对分子质量		
		实测值	理论值	误差($\times 10^{-6}$)
α_1 : (R) ¹⁰⁶⁶ GETGPAGPAGPIGPVGAR ¹⁰⁸³ (G)	780.9135 ²⁺	1559.8124	1559.8056	4.37
α_2 : (R) ³²⁶ GI*PGPVGAAGATGAR ³⁴⁰ (G)	634.3439 ²⁺	1266.6732	1266.6680	4.07
α_2 : (R) ⁵⁹⁰ GP*PGESGAAGPTGPIGSR ⁶⁰⁷ (G)	790.8903 ²⁺	1579.7660	1579.7590	4.41

表 3 猪明胶的共有特征性多肽

Table 3 Common characteristic peptides of porcine gelatin

猪明胶的特征多肽序列	m/z	相对分子质量		
		实测值	理论值	误差($\times 10^{-6}$)
α_1 : (R) ¹⁰⁵² GETGPAGPAGPVG PVGAR ¹⁰⁶⁹ (G)	773.9060 ²⁺	1545.7974	1545.7900	4.82
α_2 : (R) ⁹⁷⁹ GE*PGPAGSVGPAGAVGPR ⁹⁹⁶ (G)	774.8956 ²⁺	1547.7766	1547.7692	4.77
α_2 : (R) ⁵⁷⁴ GI*PGEFGL*PG*PAGPR ⁵⁸⁸ (G)	735.3757 ²⁺	1468.7368	1468.7310	3.92
α_2 : (R) ⁵⁷⁴ GI*PGEFGL*PGPAGPR ⁵⁸⁸ (G)	727.3785 ²⁺	1452.7424	1452.7361	4.32
α_2 : (R) ³⁸² GPNGEVGSAGP*PGP*PGLR ³⁹⁹ (G)	824.4115 ²⁺	1646.8084	1646.8013	4.34

含有这条特征多肽;同时,课题组在前期检测纯的猪明胶和混合明胶体系,以及 ^{18}O 标记定量检测猪明胶的特征性多肽的研究中也发现了这条特征多肽^[20,22],表明其稳定性较高,在猪明胶的溯源中可发挥十分重要的作用。

综合表 1、表 2 和表 3 可知,如不考虑氨基酸残基修饰的情况,从 4 种阿胶块中检出阿胶、牛明胶和猪明胶的共有特征性多肽片段数量分别为 10、3、4 个,其中来自 α_1 链的数目分别为 4、1、1 个,来自 α_2 链的数目分别为 6、2、3 个。以上结果表明,不论阿胶、牛明胶或是猪明胶, α_2 链检出的特征性多肽片段均高于 α_1 链,这主要是由于在驴皮、牛皮和猪皮胶原蛋白中, α_2 链的差异性大于 α_1 链。前期研究表明,对于 α_1 链,牛-猪、牛-驴和猪-驴胶原蛋白的相似度分别为 95.9%、96.6% 和 95.3%;对于 α_2 链,牛-猪、牛-驴和猪-驴胶原蛋白的相似度分别为 95.3%、94.9% 和 94.7%^[20]。因此,与 α_1 链相比,稍高的差异使得 α_2 链经过明胶制备、酶解等工序后能游离出更多被质谱检测到的特征性多肽片段。

3 结论

本文以最受消费者青睐的阿胶块为原料,向其中分别加入低含量(1 mg/mL)的牛明胶和猪明胶,采用 HPLC-MS/MS 分别鉴定阿胶、牛明胶和猪明胶的特征性多肽。结果表明,不同品牌的阿胶块产品被检出的阿胶特征性多肽数目有所不同,其中 18 个特征性多肽为 4 种不同品牌阿胶块的共有特征性多肽,对阿胶块产品中阿胶成分的溯源鉴定具有十分重要的意义。当加入低含量的牛明胶和猪明胶时,在阿胶块中检测出 3 个牛明胶的共有特征性多肽和 5 个猪明胶的共有特征性多肽,这些稳定检出的特征性多肽可作为阿胶块中低含量牛明胶和猪明胶掺假的鉴定依据。该研究结果可为阿胶块产品的质量监管提供一定的理论依据。本文以阿胶块为原料开展了掺假鉴定研究,然而,其他产品(如阿胶口服液、阿胶糕等)的明胶溯源鉴定同样值得关注,后续将对其他类型的阿胶产品开展溯源研究,为阿胶产品的质量控制提供依据。

参考文献

[1] 韩晶. 阿胶通过抵抗免疫细胞凋亡起到免疫保护的作用[D]. 北京: 北京协和医学院, 2018. [HAN J. The traditional Chinese medicine Ejiao is an immunoprotective agent against apoptosis[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2018.]

[2] 刘艳艳, 董书光, 耿加亮, 等. 阿胶加工工艺过程中 DNA 降解规律研究[J]. 药学研究, 2016, 35(9): 501-507. [LIU Y Y, DONG S G, GENG J L, et al. DNA degradation of Colla Corii Asini during processing[J]. Journal of Pharmaceutical Research, 2016, 35(9): 501-507.]

[3] 朱茜. 预见 2021:《2020 年中国阿胶产业全景图谱》(附市场规模、竞争情况、发展趋势等)[EB/OL]. (2021-01-13) [2021-3-10]. <https://www.qianzhan.com/analyst/detail/220/210113-de40df84.html>. [ZHU Q. Forecast of 2021: Panorama of China

Ejiao industry in 2020 (with market size, competition, development trend, etc.)[EB/OL]. (2021-01-13) [2021-3-10]. <https://www.qianzhan.com/analyst/detail/220/210113-de40df84.html>.]

[4] 王思婷. 预见 2019:《2019 年中国阿胶产业全景图谱》: 行业门槛逐步提高 阿胶产品价格将进入调整期 [EB/OL]. (2019-05-07) [2020-12-21]. <https://www.qianzhan.com/analyst/detail/220/190506-abd58d3c.html>. [WANG S T. Forecast of 2019: Panorama of China Ejiao industry in 2019: The industry threshold gradually increases and the price of Ejiao products will enter the adjustment period[EB/OL]. (2019-05-07) [2020-12-21]. <https://www.qianzhan.com/analyst/detail/220/190506-abd58d3c.html>.]

[5] 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.]

[6] 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. Study on fingerprints of liposoluble constituents in several animals[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2015.]

[7] 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 in quality control of raw materials and products of gelatin[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2015.]

[8] CEBI N, DOGAN C E, MESE A E, et al. A rapid ATR-FTIR spectroscopic method for classification of gelatin gummy candies in relation to the gelatin source[J]. Food Chemistry, 2019, 277: 373-381.

[9] YAP B K, GAM L. Differentiation of bovine from porcine gelatin capsules using gel electrophoresis method[J]. Food Chemistry, 2019, 274: 16-19.

[10] ABDULLAH AMQIZAL H I, AL-KAHTANI H A, ISMAIL E A, et al. Identification and verification of porcine DNA in commercial gelatin and gelatin containing processed foods[J]. Food Control, 2017, 78: 297-303.

[11] LEE J H, KIM M R, JO C H, et al. Specific PCR assays to determine bovine, porcine, fish and plant origin of gelatin capsules of dietary supplements[J]. Food Chemistry, 2016, 211: 253-259.

[12] TUKIRAN N A, ISMAIL A, MUSTAFA S, et al. Development of anti-peptide enzyme-linked immunosorbent assay for determination of gelatin in confectionery products[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2016, 51(1): 54-60.

[13] TUKIRAN N A, ISMAIL A, MUSTAFA S, et al. Determination of porcine gelatin in edible bird's nest by competitive indirect ELISA based on anti-peptide polyclonal antibody[J]. Food Control, 2016, 59: 561-566.

[14] WARD S, POWLES N T, PAGE M I. Peptide biomarkers for identifying the species origin of gelatin using coupled UPLC-MS/MS[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2018, 73: 83-90.

[15] FLAUDROPS C, ARMSTRONG N, RAOULT D, et al. De-

- termination of the animal origin of meat and gelatin by MALDI-TOF-MS[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2015, 41: 104–112.
- [16] JANNAT B, GHORBANI K, SHAFIEYAN H, et al. Gelatin speciation using real-time PCR and analysis of mass spectrometry-based proteomics datasets[J]. *Food Control*, 2018, 87: 79–87.
- [17] KLEINNIJENHUIS A J, VAN HOLTHOON F L, HERREGODS 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.
- [18] CHENG X L, WEI F, XIAO X Y, 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]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2012, 62(2): 191–195.
- [19] 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 equine-hide gelatin in Ejiao by UPLC-MS[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2019, 39(5): 864–869.]
- [20] SHA X M, HU Z Z, 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.
- [21] 陆澜清. 2018年阿胶行业竞争现状与趋势分析 成本压力推动多元化发展[EB/OL]. (2018-05-04) [2020-12-24]. <https://www.qianzhan.com/analyst/detail/220/180504-da15be21.html>. [LU L Q. Analysis of competition status and trend of Ejiao industry in 2018 cost pressure promotes diversified development[EB/OL]. (2018-05-04) [2020-12-24]. <https://www.qianzhan.com/analyst/detail/220/180504-da15be21.html>.]
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] SCHRIEBER R, GAREIS H. Gelatine handbook: Theory and industrial practice[M]. Weinheim: Wiley-VCH, 2007.
- [25] LIN S, SAMUEL W, MICHELLE G C, et al. Stable-isotope-labeled histone peptide library for histone post-translational modification and variant quantification by mass spectrometry[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2014, 13(9): 2450–2466.
- [26] SHA X M, WANG G Y, LI X, et al. Identification and quantification of gelatin by a high-resolution mass spectrometry-based label-free method[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 101: 105476.
- [27] WU L C, WANG S X, TIAN L, et al. Comparative proteomic analysis of the maize responses to early leaf senescence induced by preventing pollination[J]. *Journal of Proteomics*, 2018, 177: 75–87.
- [28] YILMAZ M T, KESMEN Z, BAYKAL B, et al. A novel method to differentiate bovine and porcine gelatins in food products: NanoUPLC-ESI-Q-TOF-MS^E based data independent acquisition technique to detect marker peptides in gelatin[J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(3): 2450–2458.
- [29] ZHANG G F, 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[J]. *Food Hydrocolloids*, 2009, 23(7): 2001–2007.
- [30] 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.
- [31] SHA X M, TU Z C, WANG H, et al. Gelatin quantification by oxygen-18 labeling and liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(49): 11840–11853.
- [32] CEBI N, DURAK M Z, TOKER O S, et al. An evaluation of fourier transforms infrared spectroscopy method for the classification and discrimination of bovine, porcine and fish gelatins[J]. *Food Chemistry*, 2016, 190: 1109–1115.
- [33] KANG S S N, LEE H G, KIM H. 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.