

- [17] 高 炜, 刘剑波, 朱明扬, 等. 4 种柠檬不同组织的酚类物质分布及其抗氧化特性[J]. 中国食品学报, 2019, 19(2): 281-290.
- [18] 翁夏蒙, 鲁光耀, 王莺妮, 等. 白及愈伤组织总酚含量测定及抗氧化作用研究[J]. 中药材, 2013, 36(1): 32-35.

SPE-UPLC-MS/MS 法鉴别含龟鳖甲的中成药

刘宇文, 伍 勋, 谌 宇, 邹耀华, 侯 娜
(杭州市食品药品检验研究院, 浙江 杭州 310022)

摘要: 目的 建立固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱 (SPE-UPLC-MS/MS) 法鉴定含龟鳖甲的中成药。方法 该药物提取液的分析采用 Eclipse Plus 十八烷基硅烷键合硅胶填料色谱柱 (2.1 mm×150 mm, 1.8 μm); 流动相乙腈-0.1% 甲酸, 梯度洗脱; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 35 °C; 进样量 1 μL; ESI⁺离子源; MRM 模式。结果 18 批含鳖甲的中成药中均检出鳖甲(鳖)类成分, 其中还有 1 批同时检出珍珠鳖甲类成分; 17 批含龟甲的中成药中有 2 批只检出龟甲(乌龟)类成分。结论 含龟鳖甲的中成药质量整体上不理想, 需引起有关部门关注。

关键词: 中成药; 龟甲; 鳖甲; 化学成分; 固相萃取-液质联用法 (SPE-UPLC-MS/MS)

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)02-0660-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.02.061

鳖甲、龟甲均收载于 2020 年版《中国药典》一部, 均为单一来源中药, 分别为鳖的背甲和乌龟的背甲及腹甲^[1], 本课题组前期研究和有关文献均显示当前混伪情况在龟鳖甲类中药中较多^[2-3], 这些混伪品有可能会转移到中成药中, 因此其质量如何也需要研究人员密切关注。

传统的性状鉴别是龟鳖甲类药材的主要鉴别手段, 但对于含该类药材的中成药并不适用, 分子鉴定技术在龟鳖甲类药材的报道较多, 推广到中成药也还不成熟^[4-7]。近年来, 特征肽段专属性鉴别方法在胶类药材监管中应用成熟^[8-13], 课题组结合相关研究, 拟将超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 法与固相萃取小柱 (SPE) 联合应用, 建立可用于检测中成药中 11 种龟鳖甲(乌龟、巴西红耳龟、花龟、黄喉水龟、黄缘闭壳龟、缅甸陆龟、小鳄龟、印度棱背龟、鳖、角鳖、珍珠鳖)类成分的专属性方法。

1 材料

1.1 仪器 G6495B 型超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱仪 (美国 Agilent 公司), 配置 MPP (MassProfiler Professional) (Ver. B. 14.00)、MassHunter (Ver. B. 10.00); XS205 型电子天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司); TW-8 型恒温水浴锅 (深圳市优博莱科技有限公司)。

1.2 试剂 Oasis 亲生亲油平衡固相萃取柱 (美国 Waters 公司, 批号 150A37158B); 测序用胰蛋白酶 (美国 Sigma 公司, 批号 SLBZ8570)。碳酸氢铵 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司, 批号 20190911); 乙腈 (美国 Tedia 公司, 批号 AS1122-001, 质谱纯); 甲酸 (美国 Thermo Fisher

Scientific 公司, 批号 100291, 质谱纯); 水为超纯水。

1.3 药材 鳖 *Trionyx sinensis* Wiegmann、乌龟 *Chinemys reevesii* (Grsy)、巴西红耳龟 *Trachemys scripta elegans* (Wied.)、黄喉水龟 *Clemmys mutica* (Cantor)、花龟 *Ocadia sinensis* (Gray)、小鳄龟 *Chelydra serpentina* (Linnaeus)、黄缘闭壳龟 *Cyclemys flavomarginata* Gray.、缅甸陆龟 *Testudo elongate* (Blyth)、印度棱背龟 *Kachuga tectum* (Gray)、角鳖 *Apalone spinifera*、珍珠鳖 *Apalone ferox* (Schneider) 对照药材经杭州市食品药品检验研究院诸葛陇副主任中药师鉴定为正品, 标本保存于杭州市食品药品检验研究院中药天然药物检验所标本室中。35 批市售中成药涉及 19 个品种, 其中 18 批含鳖甲类成分, 17 批含龟甲类成分, 具体见表 1。

2 方法与结果

2.1 分析条件

2.1.1 色谱 Eclipse Plus 十八烷基硅烷键合硅胶填料色谱柱 (2.1 mm×150 mm, 1.8 μm); 流动相乙腈 (A)-0.1% 甲酸 (B), 梯度洗脱, 程序见表 2; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 35 °C; 进样量 1 μL。

2.1.2 质谱 ESI⁺离子源; MRM 模式, 正负离子切换扫描; 毛细管电压 4 kV; 锥孔电压 166 V; 源区温度 325 °C; 干燥气温度 200 °C; 体积流量 14 L/min; 雾化器压力 50 psi (1 psi=6.895 kPa); 雾化气、碰撞气 N₂。

2.1.3 特征离子对 MRM 条件建立 本课题组提取 11 种龟鳖甲的蛋白溶液, 以胰蛋白酶酶解对照药材溶液, 利用高

收稿日期: 2020-02-27

基金项目: 浙江省药品监督管理局科技计划项目 (2019009, 2022003); 杭州市农业与社会发展科研项目 (20191203B70)

作者简介: 刘宇文 (1979—), 男, 副主任中药师, 从事中药质量控制研究。Tel: (0571) 85460802, E-mail: liuyuwen01@126.com

表1 中成药信息

编号	名称	成分	生产厂家	批号
1	乌鸡白凤丸	鳖甲	A	190502
2	乌鸡白凤丸	鳖甲	B	1803030
3	乌鸡白凤丸	鳖甲	B	1810070
4	乌鸡白凤丸	鳖甲	C	180906
5	乌鸡白凤丸	鳖甲	D	1901037
6	乌鸡白凤丸	鳖甲	E	171104
7	乌鸡白凤丸	鳖甲	F	190302
8	乌鸡白凤丸	鳖甲	G	J06021
9	乌鸡白凤丸	鳖甲	G	K06014
10	乌鸡白凤丸	鳖甲	C	181201
11	乌鸡白凤丸	鳖甲	C	191027
12	乌鸡白凤丸	鳖甲	H	1804004
13	小儿肺咳颗粒	鳖甲	J	20170401
14	蛤蚧定喘胶囊	鳖甲	M	180903
15	肝爽颗粒	鳖甲	N	181108
16	调经益灵片	鳖甲	O	180102
17	回生口服液	鳖甲	P	181003
18	恒古骨伤愈合剂	鳖甲	Q	20180119
19	健脑安神片	龟甲	R	190301
20	妇科止带胶囊	龟甲	S	181105
21	人参再造丸	龟甲	T	17014400
22	人参再造丸	龟甲	Y	RB02019
23	参茸延龄片	龟甲	U	20180511
24	大补阴丸	龟甲	H	181014
25	大补阴丸	龟甲	V	190901
26	龟鹿二仙膏	龟甲	W	20180725
27	龟鹿补肾片	龟甲	X	20181001
28	坤宝丸	龟甲	U	181202
29	坤宝丸	龟甲	T	17035244
30	河车大造丸	龟甲	T	1601097
31	三宝胶囊	龟甲	X	180701
32	三宝胶囊	龟甲	K	180903
33	固经丸	龟甲	I	181019
34	妙济丸	龟甲	L	181002
35	妙济丸	龟甲	Z	180804

表2 梯度洗脱程序

时间/min	A 乙腈/%	B 0.1% 甲酸/%
0	5	95
25	20	80
50	5	95

效液相色谱-四级杆飞行时间质谱 (HPLC-Q-TOF) 与化学统计分析相结合进行分析, 获得的质谱原始数据进行预处理, 以分子特征提取模式提取保留时间和质荷比 (m/z) 参数, 作为一个数据对 (EMRT 数据对), 并剔除异常数据结果, 保存为 CEF 文件。总离子流图 CEF 文件采用 MPP 软件进行统计分析, 11 种龟鳖甲各自特征肽段信息被查找到, 再将特征肽段信息导入安捷伦定性分析软件 Agilent Qualitative Analysis B. 10.00 进行再验证确认, 最终确定了 11 种龟鳖甲的专属性特征肽段^[3,14-15]。针对筛选出的特征

肽段, 通过串联质谱平台建立 MRM 方法, 详细信息见表 3。

表3 特征离子 MRM 采集参数

种类	t/min	母离子 m/z	子离子 m/z	离子模式	碰撞能量/eV
乌龟	10.1	442.7	631.0	+	30
			560.0	+	20
巴西红耳龟	11.2	400.2	374.2	+	30
			143.1	+	25
花龟	19.1	574.8	223.1	+	20
			464.2	+	10
黄喉水龟	20.3	709.9	647.1	+	20
			587.0	+	20
黄缘闭壳龟	15.9	1 014.1	627.8	+	30
			476.3	+	20
缅甸陆龟	10.8	536.8	171.0	+	20
			143.0	+	30
小鳄龟	16.3	773.8	680.9	+	20
			1 206.6	+	30
印度棱背龟	15.6	742.6	372.1	+	20
			806.8	+	23
鳖	16.7	784.9	872.4	+	30
			1 028.5	+	30
角鳖	18.8	932.1	743.3	+	30
			1 100.0	+	30
珍珠鳖	4.3	551.7	675.3	+	30
			143.0	+	20

2.2 对照药材溶液制备 取对照药材 (粉碎, 过 4 号筛) 各约 1 g, 精密称定, 置于 150 mL 具塞锥形瓶中, 加入 50 mL 超纯水, 称定质量, 室温浸泡 1 h, 加热回流 1 h, 放冷, 超纯水补足减失的质量, 加入 0.5 g NH_4HCO_3 , 使溶解并摇匀, 滤过, 精密度量取续滤液 1 mL 至 5 mL 量瓶中, 加新制胰蛋白酶溶液 1 mL (1 mg/mL 1% NH_4HCO_3 溶液), 1% NH_4HCO_3 溶液稀释, 定容至刻度, 摆匀, 37 ℃ 酶解 12 h, 即得^[3]。

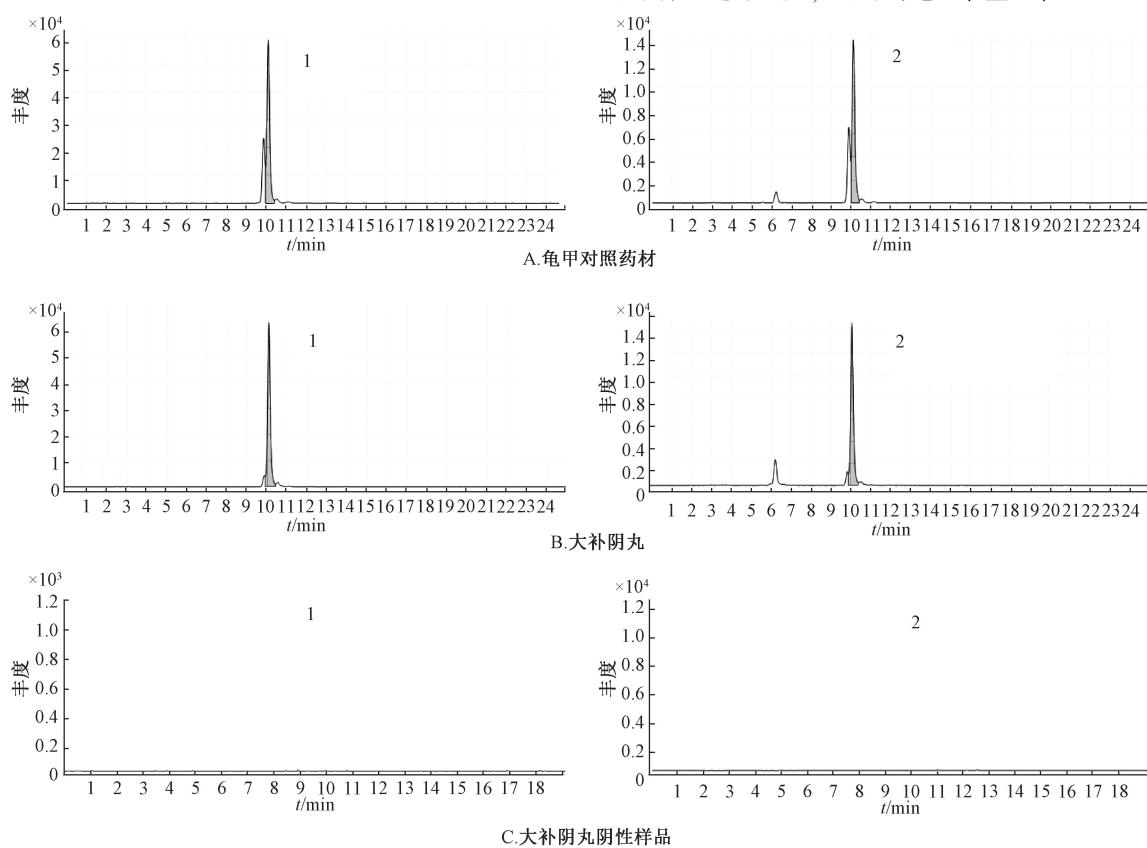
2.3 供试品溶液制备 取 35 批样品 (固体粉碎并过 4 号筛, 液体适量混匀) 适量, 加入超纯水混匀 (约相当于处方中原药材 1 g), 精密称定质量, 置于 150 mL 具塞锥形瓶中, 按“2.2”项下方法制备, 再用 HLB 固相萃取小柱净化酶解液, 即得。

2.4 阴性样品溶液制备 按照处方制备不含龟鳖甲类成分的阴性样品适量, 按“2.3”项下方法制备, 即得。

2.5 肽段纯化及条件优化 采用 HLB 固相萃取小柱净化酶解液^[16], 先进行 HLB 固相萃取小柱活化 (依次用 1 mL 甲醇、1 mL 1% 甲酸活化), 然后取 1 mL 对照品酶解液加到 SPE 小柱上, 再依次用 5% 甲醇、1% 甲酸进行洗脱, 用 1 mL 含 1% 甲酸-乙腈 (80 : 20) 溶液分次洗脱, 收集洗脱液, 洗脱液用氮气吹干, 用 500 μL 含 0.1% 甲酸-乙腈 (95 : 5) 复溶, 为进一步考察固相萃取过程对目标特征多肽的损失, 分别取 11 种龟鳖甲对照药材酶解溶液过 HLB 柱, 结果见表 4。

表4 对照药材特征肽固相萃取纯化效果 ($n=3$)

对照药材	平均回收率/%	精密度/%
乌龟	89.5	4.3
巴西红耳龟	95.7	3.5
花龟	91.8	6.6
黄喉水龟	88.3	4.5
黄缘闭壳龟	87.4	5.2
缅甸陆龟	90.5	4.1
小鳄龟	93.7	3.9
印度楞背龟	87.6	4.2
鳖	95.3	3.9
角鳖	91.3	4.1
珍珠鳖	90.9	5.6



注：1为质荷比442.7（双电荷）~560.0，2为质荷比442.7（双电荷）~631.0。

图1 龟甲类成分的特征分子离子峰色谱图

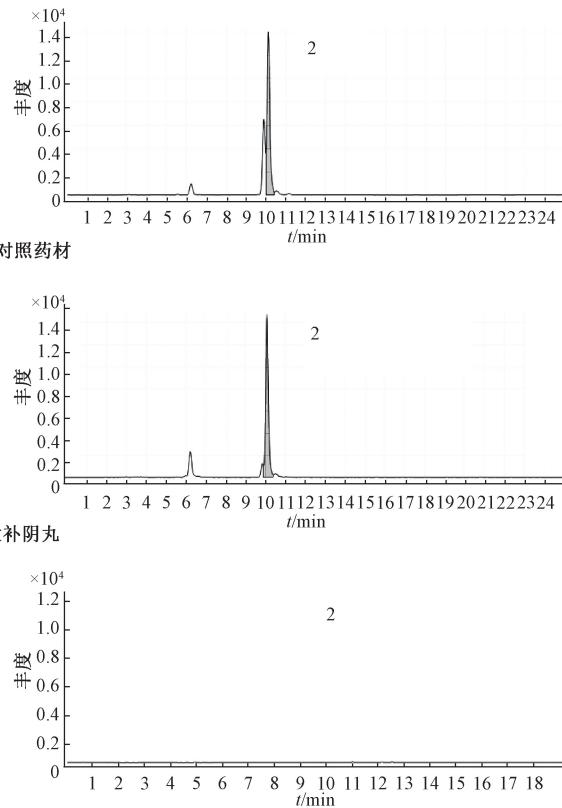
花龟甲、黄喉水龟甲、黄缘闭壳龟甲、缅甸陆龟甲、小鳄龟甲、印度楞背龟甲、角鳖甲、珍珠鳖甲峰面积RSD分别为6.6%、5.4%、4.9%、7.1%、6.6%、8.2%、5.3%、5.8%、5.7%、6.2%、4.7%，表明溶液在48 h内稳定性良好。

2.8 检测限 将对照药材溶液逐级稀释后，在“2.1”项条件下进样测定，以信噪比3:1为检测限，测得乌龟甲、鳖甲、巴西红耳龟甲、花龟甲、黄喉水龟甲、黄缘闭壳龟甲、缅甸陆龟甲、小鳄龟甲、印度楞背龟甲、角鳖甲、珍珠鳖甲检测限分别为0.04、0.1、0.1、0.8、2、1、0.1、1、1、0.5、0.1 g/L。

2.9 重复性试验 取同一批大补阴丸6份（批号181014），

2.6 专属性试验 按“2.4”项下方法制备大补阴丸的阴性样品溶液，再以龟甲对照药材、含龟甲类成分中成药为阳性对照，按“2.3”项下方法制备相应阳性对照药材溶液，选择龟甲（乌龟）特征离子对 m/z 442.7（双电荷）~631.3和 m/z 442.7（双电荷）~560.3，在“2.1”项条件下进样测定，结果见图1。由此可知，在与阳性对照药材溶液色谱图中相应位置上，阴性样品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。同法对其他中成药进行专属性实验，也得到类似结果。

2.7 稳定性试验 取对照药材适量，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，于0、6、12、18、24、48 h在“2.1”项条件下进样测定，测得乌龟甲、鳖甲、巴西红耳龟甲、



按“2.3”项下方法制备供试品溶液，采用龟甲（乌龟）的特征离子对 m/z 442.7（双电荷）~631.3和 m/z 442.7（双电荷）~560.3，在“2.1”项条件下进样测定，测得上述特征离子对峰均有检出，表明该方法重复性良好。

2.10 结果分析 18批含鳖甲的中成药均检出鳖甲（鳖）类成分，其中还有1批检出珍珠鳖甲类成分；17批次含龟甲类成分中成药中有2批只检出龟甲（乌龟）类成分，6批只检出巴西红耳龟甲类成分，4批同时检出龟甲、巴西红耳龟甲类成分，3批同时检出龟甲、巴西红耳龟甲、小鳄龟甲类成分，1批同时检出龟甲、巴西红耳龟甲、小鳄龟甲、缅甸陆龟甲、花龟甲及鳖甲类成分，1批未检出龟甲类成分，可能未投料或投料量太少。由此可知，含龟甲的中

成药大多存在伪品混充或者掺伪情况，仅 12% 的原料药材基源符合 2020 年版《中国药典》规定，提示各有关部门应对该类中成药的质量控制引起足够重视，虽然含鳖甲的中成药情况稍好，但有关部门也需加强监管。

3 讨论

龟鳖甲类药材在我国使用历史悠久，均具有补阴益气的功效，也是众多中成药的原料，例如大补阴丸、小儿肺咳颗粒、龟鹿二仙膏、化癥回生片、龟鳖丸、鹿龟酒等。前期研究发现，龟甲掺伪情况较为严重，例如，巴西红耳龟、小鳄龟、中华花龟等，常有混入龟鳖甲药材中。由于龟鳖甲类药材品种基源的混乱，必然会造成含龟鳖甲的中成药质量的不可控，不利于该类中成药的系统深入研究，也将增加监管的和风险和难度，同时，国家已出台一些列法律法规加强对野生动物的保护，如何防止诸如缅甸陆龟等保护野生进入中药领域，也是急需研究的课题。

龟鳖甲类药材传统性状鉴别存在着很大的局限性，而中成药中的龟鳖甲类成分已粉碎或提取过，性状鉴别更是无能为力。龟鳖甲类药材报道较多的 DNA 分子鉴定技术，应用于中成药尚有一定难度。蛋白质、多肽等成分在龟鳖甲类药材占主要部分，也是其重要的活性成分之一，利用串联质谱识别不同种源的龟鳖甲类药材酶解后的溶液，可达到鉴别的目的。本实验结合前期相关研究，最终建立了适合多种含龟鳖甲类中成药的串联质谱特征肽专属性检测方法。本实验所建立的串联质谱特征肽检测方法专属性强，可用于含龟鳖甲类成分中成药质量控制，鉴于每种中成药中龟鳖甲类药材的投料比例有所不同，建议检测时适当调整取样量，本课题组下一步将拟研究建立含龟鳖甲类成分中成药特征离子含量测定方法，用于该类中成药的控制质量。

研究发现，由于多为生粉投料，含龟鳖甲类成分中成药采用超声法提取效率不高^[17-18]，最终确定采用加热回流提取法提取，效果较好。研究还发现，对照品酶解液含较多杂质会对检测结果有影响，可用固相萃取小柱来净化，先用 5% 甲醇可清洗极性的蛋白质等物质和盐，也可以防止孔堵塞，再 20% 酸性乙腈可洗脱目标物，非目标物留在固相萃取小柱上，达到了净化酶解液的目的。

从实验结果分析，由于龟甲价格远高于巴西红耳龟甲，龟甲类成分中成药中主要混伪品为巴西红耳龟甲^[3]，质量不容乐观，建议急需加强监管。另外，含鳖甲类成分中成药检测结果，仅 1 批检出混淆珍珠鳖甲类成分，表明质量状况尚好，可能因为鳖养殖量已经非常大，成熟的养殖技术完全能够满足临床用药需要。

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，2020：187；402.
- [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] 刘宇文，邹耀华，侯娜. 特征肽技术用于龟甲（浙龟甲）中掺巴西龟的检查研究[J]. 中国现代应用药学，2019，36(22)：2810-2813.
- [4] 程素倩，袁媛，刘富艳，等. 特异性 PCR 方法鉴别鳖甲药材和饮片[J]. 中国中药杂志，2018，43(23)：4569-4574.
- [5] 茅纯，郑娟，施思，等. 浙龟甲的 PCR 鉴别研究[J]. 中国现代应用药学，2019，36(11)：1363-1366.
- [6] 李楠，虞平添，焦兆群，等. 特异性扩增技术鉴定龟甲与鳖甲[J]. 中成药，2018，40(10)：2328-2333.
- [7] 李松播. PCR 技术及质谱法在生化药品动物源性成分鉴定中的应用[D]. 上海：中国医药工业研究总院，2020.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 王玉琴，刘华，郝红元，等. 固相萃取-液相色谱/质谱联用法测定猪肉中 3 种多肽类抗生素[J]. 分析试验室，2017，36(1)：73-77.
- [11] 魏佳会，陈佳，吴弼东，等. 高效液相色谱/三重四极杆质谱联用法测定血浆和尿液中鹅膏肽类毒素[J]. 分析化学，2020，48(3)：405-412.
- [12] 徐清，李梦，罗雪梅，等. 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术鉴别龟甲及其混伪品[J]. 中国现代中药，2019，21(9)：1251-1255.
- [13] 唐敏，严建业，任杰，等. 基于 UPLC-QTOF/MS 和 UNIFI 二元比较鉴别巴西龟甲胶和草龟龟甲胶[J]. 数字中医药，2019，2(1)：50-58.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 古淑青，詹丽娜，赵超敏，等. 基于液相色谱-串联质谱法的肉类特征肽段鉴别及掺假测定[J]. 色谱，2018，36(12)：1269-1278.
- [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龟甲胶成分[J]. 中国药品标准，2017，18(2)：95-98.
- [18] 李洁，杨骏，何琳，等. 知柏龙胆片质量标准的研究[J]. 中成药，2019，41(4)：888-891.