

LCMS-8045 定性定量分析阿胶药材

LCMSMS-465

摘要： 本文建立了一种使用岛津高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用定性定量测定阿胶药材的方法。参照《中国药典》2020 年版，阿胶 < 含量测定 > 项对阿胶的定量要求，使用胰蛋白酶酶解阿胶样品，选择阿胶的特征肽作为定性依据，驴源多肽 A1 和驴源多肽 A2 作为定量依据；建立了 m/z 539.80>612.40 和 m/z 539.80>923.80 检测离子对， m/z 469.25>712.30 和 m/z 469.25>783.40 检测离子对， m/z 618.35> 779.40 和 m/z 618.35> 850.40 检测离子对，且对照品溶液及市售药材中阿胶特征肽的信噪比均远远大于 3:1。该方法满足《中国药典》2020 年版要求，可实现阿胶药材的快速、准确、灵敏的定性定量分析。

关键词： 高效液相色谱 三重四极杆质谱 阿胶定量 驴源多肽 阿胶鉴别

胶类药材是具有典型民族特色的传统中药，为动物的皮熬制而成的明胶类物质。阿胶系驴皮经煎煮浓缩成的固体胶，能补血滋阴、润燥止血，用于贫血心悸、燥咳咯血、先兆流产、产后血虚、肌痿无力，是中医临床常用补益药。阿胶经水解后其胶原蛋白变为分子量更小的肽类，从而失去原有胶原蛋白的性质，这给阿胶鉴别带来一定难度。2015 版《中国药典》对阿胶的定性采用液质联用的方法检测阿胶特征肽段，其后，发布了新阿胶（猪皮源）、牛皮源等以次充好样品补充检验方法。《中国药典》2020 年版，阿胶 <

含量测定 > 保留了氨基酸项，增加了特征多肽项，采用液相色谱 - 串联质谱法 (LC-MS/MS) 对驴源多肽 A1 ($C_{41}H_{68}N_{12}O_{13}$) 和驴源多肽 A2 ($C_{51}H_{82}N_{18}O_{18}$) 进行测定，并规定阿胶中驴源多肽 A1 和驴源多肽 A2 总量计应不得少于 0.15%。

本文利用岛津三重四极杆液质联用系统 LCMS-8045 对阿胶中的定性特征肽段及驴源多肽进行了分析，建立了阿胶定性定量分析方法，可为该类样品的分析提供参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津高效液相色谱仪 LC-20A_{XR} 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。具体配置为 LC-20AD_{XR} × 2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-20ACMP 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8045 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.89 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack GIST C18 (100 mm × 2.1 mm I.D., 2.0 μm, SGLC P/N: 227-30001-04)

流动相：A 相 - 0.1% 甲酸水溶液
B 相 - 乙腈

流速：0.30 mL/min

柱温：40°C

进样体积：5 μL

洗脱方式：采用梯度洗脱，B 相初始浓度为 5%，时间程序见表 1

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Action	Value
0.00	Pumps	Pump B Conc.	5
20.00	Pumps	Pump B Conc.	20
40.00	Pumps	Pump B Conc.	50
40.10	Pumps	Pump B Conc.	5
50.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式: ESI+	DL 温度: 250°C
离子源接口电压: 4.5 kV	加热模块温度: 400°C
雾化气: 氮气 3.0 L/min	接口温度: 300°C
加热气: 干燥空气 10.0 L/min	干燥气: 氮气 10.0 L/min
驻留时间: 10 ms	MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 优化参数

化合物名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
驴皮特征肽段	539.80	612.40	-38	-22	-22
		923.80	-38	-24	-40
驴源多肽 A ₁	469.25	712.30	-16	-21	-32
		783.40	-18	-20	-28
驴源多肽 A ₂	618.35	779.40	-24	-25	-32
		850.40	-22	-28	-26

1.3 对照品和样品配制

供试品制备: 取本品粉末 0.1 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加 1% 碳酸氢铵溶液 40 mL, 超声处理 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 分钟, 加 1% 碳酸氢铵溶液稀释至刻度, 摇匀。精密量取 1 mL 至 5 mL 量瓶中, 加胰蛋白酶溶液 (取序列分析级胰蛋白酶, 加 1% 碳酸氢铵溶液制成每 1 mL 中含 1 mg 的溶液, 临用前新制) 1 mL, 加 1% 碳酸氢铵溶液稀释至刻度, 摇匀, 37°C 恒温酶解 12 小时, 滤过, 取续滤液, 即得。

对照溶液的制备: 取驴源多肽 A₁ 对照品、驴源多肽 A₂ 对照品适量, 精密称定, 加 1% 碳酸氢铵溶液分别制成每 1 mL 含 2.5 μg 的混合溶液, 即得。

标准曲线配制: 精密量取对照品溶液 1 mL、2 mL、5 mL、10 mL、20 mL 和 25 mL, 分别置 50 mL 量瓶中, 加 1% 碳酸氢铵溶液稀释至刻度, 制成标准曲线溶液。分别精密吸取不同浓度的标准曲线溶液与供试品溶液各 5 μL, 注入高效液相色谱 - 质谱联用仪, 以对照品峰面积为纵坐标, 对照品浓度为横坐标制备标准曲线。从标准曲线读出供试品溶液中相当于驴源多肽 A₁ 和驴源多肽 A₂ 的量, 计算即得。

■ 结果与讨论

2.1 阿胶对照药材的 MRM 色谱图

LC-MS/MS 分析, 获得阿胶对照药材的 MRM 色谱图, 阿胶特征肽保留时间为 6.75 min, 驴源多肽 A₁ 保留时间为 4.51 min, 驴源多肽 A₂ 保留时间为 5.37 min, 图 1 中两对特征离子对 539.8>612.4 以及 539.8>923.8 的信噪比分别为 849 和 945, 满足药典中要求的色谱峰信噪比大于 3:1 的要求。

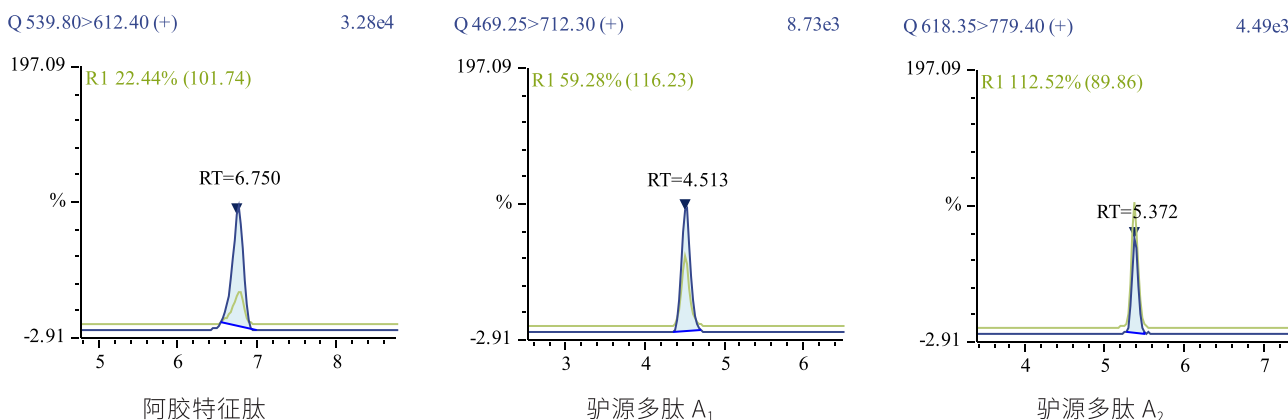


图 1 阿胶对照药材特征多肽的 MRM 色谱图

2.2 标准曲线

根据药典要求，配制标准曲线，经 LCMS-8045 分析后，以峰面积对浓度作图，绘制外标曲线。驴源多肽 A₁ 和驴源多肽 A₂ 标准曲线见图 2，标准曲线方程及相关系数等参数见表 3。驴源多肽 A₁ 和驴源多肽 A₂ 在 0.05-1.25 μg/mL 范围内，线性良好，相关系数均大于 0.995。

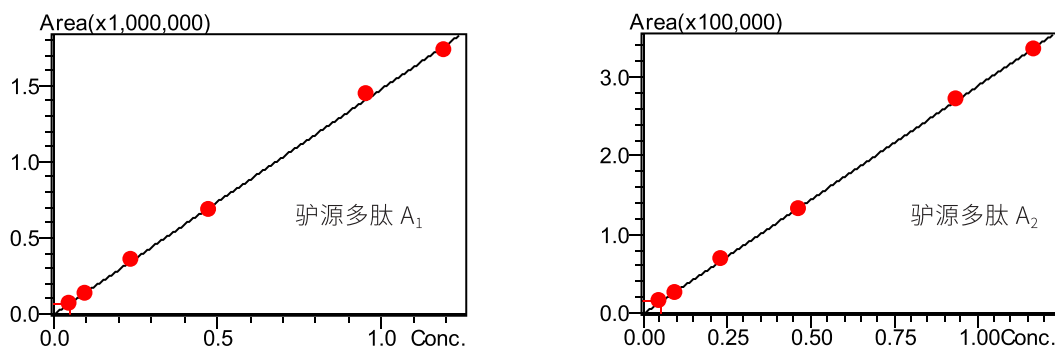


图 2 驴源多肽 A₁ 和驴源多肽 A₂ 的标准曲线图

表 3 驴源多肽 A₁ 和驴源多肽 A₂ 标准曲线

名称	标准曲线	线性范围 (μg/mL)	相关系数 R	准确度 (%)
驴源多肽 A ₁	$Y = (1.48188e+006)X - 6580.04$	0.05-1.25	0.9995	94.3-105.5
驴源多肽 A ₂	$Y = (290064)X - 1040.40$	0.05-1.25	0.9998	93.9-113.3

2.3 实际样品分析

对市售的一种阿胶药材供试品进行分析，结果如图 3 所示，阿胶特征肽段通道无干扰，且信噪比均大于 10 : 1，满足药典对于阿胶定性的要求，见表 4。

驴源多肽 A₁ 和驴源多肽 A₂ 色谱峰形良好，使用前述标准曲线对供试品进行定量分析，归一化含量为 0.21%，满足药典对于阿胶含量的要求，见表 5。

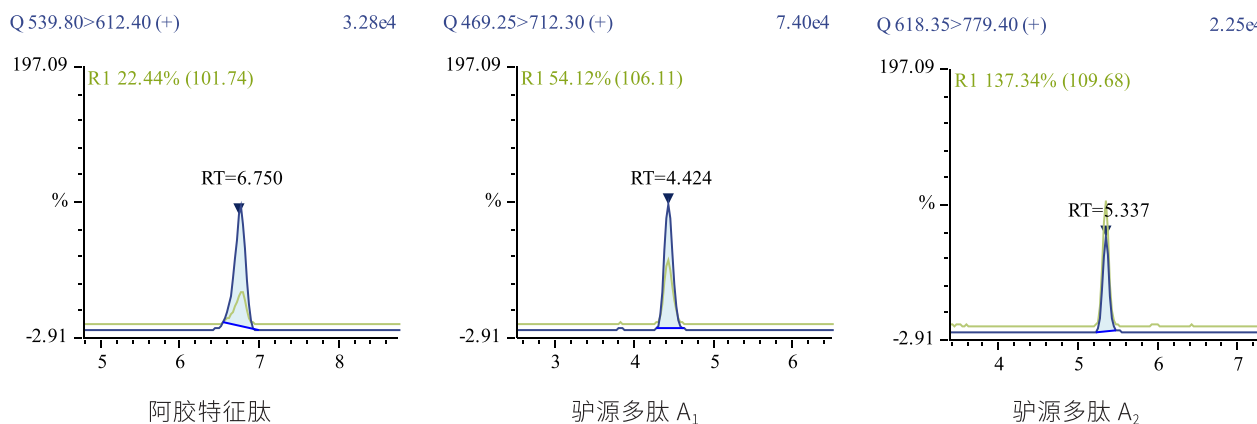


图3 市售阿胶样品的MRM色谱图

表4 实际样品中阿胶特征肽分析结果

样品编号	离子对信息	保留时间 (min)	峰高	峰面积	信噪比
阿胶特征肽	539.80>612.40	6.75	115017	1603872	1073
	539.80>923.80		45804	635228	769

表5 实际样品中驴源多肽含量结果

样品编号	离子对信息	保留时间 (min)	浓度 (µg/mL)	含量
驴源多肽 A ₁	469.25>712.30	4.42	0.38	0.21%
	469.25>783.40			
驴源多肽 A ₂	618.35>779.40	5.34	0.45	
	618.35>850.40			

结论

本文建立了一种使用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8045 鉴定阿胶中特征肽段，实现了阿胶定性定量测定。该方法所检测阿胶特征肽段 MRM 色谱图中离子对 539.80>612.40, 539.80>923.80 的响应明显，完全满足《中国药典》2020 年版要求色谱峰信噪比大于 3:1 的要求。市售阿胶药材样品分析结果表明，驴源多肽 A₁ 和驴源多肽 A₂ 在 0.05-1.25 µg/mL 范围内，线性良好，相关系数均大于 0.999。本方法满足《中国药典》2020 年版要求，可为阿胶药材的快速、准确、灵敏的定性鉴别以及定量测定提供参考。

岛津应用云



岛津企业管理(中国)有限公司 – 分析中心
Shimadzu (China) Co., LTD. – Analytical Applications Center