

· 专题 ·

胶类药材质量问题变化情况及标准研究对策[△]程显隆¹, 李明华^{1a}, 郭晓晗¹, 林永强², 魏锋^{1*}, 马双成^{1*}

1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 山东省食品药品检测研究院, 山东 济南 250101

[摘要] 胶类药材是常用传统动物药之一。目前商品胶类药材掺伪、造假情况多见, 严重影响了该类药品的安全性和有效性。和大多数动物药一样, 长期以来, 由于其化学成分特殊性 & 缺乏专属性的检测方法 & 相应的质量标准, 难以进行质量评价。无法控制企业生产胶类药材(鹿角胶、龟甲胶、阿胶)时违法掺入其他价廉异类胶原的行为, 进而导致市场上此类产品真伪难辨、质量参差不齐, 严重影响了胶类药材的流通和使用。针对上述质量问题, 根据不同动物的同类型胶原蛋白的氨基酸序列必然存在差异这一原理, 采用蛋白酶切技术对胶类药材及常见的杂皮胶进行酶切, 以超高效液相色谱-飞行时间质谱联用技术(UPLC-Q-TOF-MS)进行肽图分析, 以数学统计学对所有胶类液质联用(LC-MS)数据进行处理, 找出各种胶类的特征肽; 在此基础上, 根据特征肽二级质谱进行测序 & 进行化学合成; 建立以单体特征肽为对照, 建立专属性的定性、定量方法, 形成质量标准, 应用于胶类药材的质量控制和监管。

[关键词] 中药材; 胶类药材; 特征多肽; 质量标准。

[中图分类号] R282.74 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2020)07-0996-04

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20200316010

Change of Quality Problem of Glue Crude Drugs and Strategy of Quality Standards Research

CHENG Xian-long¹, LI Ming-hua^{1a}, GUO Xiao-han¹, LIN Yong-qiang², WEI Feng^{1*}, MA Shuang-cheng¹

1. National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China;

2. Shandong Provincial Institute for Food and Drug Control, Ji'nan 250101, China

[Abstract] Gelatin is widely used in China. Adulteration, which occurred frequently and could not be controlled, affected the safety and effectiveness of the glue crude drug. As major animal TCM, the quality of the glue crude drug could not be controlled because that the constituents is protein and the standard is lacked. Because the sequence of protein of different glue are different, In our study, we will analyze the trypsin digested samples by UPLC-Q-TOF-MS, the UPLC-MS data will be subjected to principal component analysis and an orthogonal partial least squares data analysis (OPLS-DA) to find marker peptide of different glue. We give the amino acid sequence of marker peptides base on the mass spectrometry of marker peptides, and synthesize the marker peptides. qualitative, quantitative analytic method of marker peptides were established to control the quality of glue crude drugs.

[Keywords] Chinese crude drugs; glue crude drugs; characteristic polypeptide; quality standard

中药质量控制是中药产业发展的保障。建立能有效控制中药质量的标准是中药检验工作者一直努力的方向。中药的药效是多种成分的协同作用的结果, 因此, 有学者提出, 需对全成分进行检测分析, 达到质量控制的目的。诸如特征图谱, 一标多测等

方法即是这种思路的体现。另有学者提出中药质量标志物的概念, 希望从本质上解决中药的质量问题。这些观点对于中药质量的提升起到很好的促进作用。无论何种观点, 能解决质量问题才是根本。中药品种繁多, 每个品种的质量问题不一样, 并且质量问

[△] [基金项目] 国家自然科学基金项目(81773856); 中检院学科带头人培养基金项目(2015X8)

* [通信作者] 魏锋, 研究员, 研究方向: 中药质量评价; Tel: (010)67095432, E-mail: weifeng@nifdc.org.cn
马双成, 研究员, 研究方向: 中药质量评价; Tel: (010)67095432, E-mail: cxl@nifdc.org.cn

a 并列第一作者

题也是一个动态发展的过程,不同历史时期,同一品种会有不同的质量问题。因此,需要对每个品种的质量问题进行分析,并针对质量问题找出合理的质量控制指标,达到解决质量问题才是中药质量控制的关键。本文针对胶类药材的质量问题,找出能体现质量本质的特征多肽为质量控制指标,建立质量标准。

1 存在问题

胶类药材是指由特定动物的皮、角、甲壳等加工而成的胶原蛋白,是我国特有的一类动物来源中药,临床常用的有龟甲胶、鹿角胶、阿胶等。不同胶类药材,因其动物来源及成分不同,在中医临床上的功能主治也有所差别。

由于动物胶类药材的生产原料短缺,价格昂贵,导致该类药材掺伪、造假情况非常严重。部分生产企业并非用真正龟甲、鹿角,而是以杂皮如牛皮、驴皮等投料。更有甚者,以腐烂变质的杂皮或工业皮革下脚料投料生产。2010年6月,中央电视台质量调查栏目曝光了国内市场上胶类药材存在的严重质量问题,在社会上引起了极大的反响。在2015年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)出版以前,胶类药品标准中收录的检测项目和方法专属性不强,均无法鉴别胶类药材的来源。动物药所含的成分主要为蛋白质类生物大分子,长期以来,由于基础研究薄弱及分析技术所限,动物药的分析检测难度极大,导致动物药至今没有专属性较强的检测方法,相关药品的质量标准及控制水平仍然很低。

针对胶类药材的质量控制方法,已有许多学者作过多方面的研究。围绕着胶类药材的主要成分胶原蛋白,采用多种方法进行探索,如差示扫描量热法、凝胶电泳法、二维相关红外光谱法、运动黏度法、圆二色性分析法及氨基酸分析法等^[1-2]。这些方法都是蛋白质类成分的通用检测方法,专属性不强,达不到物种鉴定的目的。另外上述方法只是对正品和纯伪品的鉴别,而对于正品中掺加部分伪品(杂皮)的问题无能为力。聚合酶链式反应(PCR)作为一种分子生物学技术,可指数级扩增特定的DNA片段,具有特异性强、灵敏度高等特点,但用在胶类药材的鉴别研究中,发现由于受熬胶时高温破坏,特定的DNA片段残存量极低,提取较困难,加上基质复杂,干扰大,经常有假阳性或假阴性的结果,

或者结果的重复性不理想,导致该法至今没有应用到胶类药材的质量标准中。

综上所述,胶类药材目前普遍存在的问题是专属性成分未明确、检测方法专属性不强、质量难以评价等。因此,找出各个胶类药材物种间的专属性成分,建立质量标准,对于合理评价龟甲胶、鹿角胶的质量,对保障人民用药安全、进行药品监管具有重要意义。

2 研究思路

胶类的主要成分是胶原蛋白,对胶原蛋白进行分析,是研究质量控制方法的重点。考虑到不同的动物,其DNA是不同的,由DNA指导合成的蛋白质序列必然存在差异性因此,本研究的关键是找出对物种鉴定有贡献的特征肽段。特征肽的寻找一般有2种方法:一种是对已知的胶原蛋白理论序列的,可以将不同动物蛋白质理论序列进行比对,找出有序列差异的肽段,设定为目标离子,采用液质联用(LC-MS)技术进行分析,建立检测方法^[3];另一种方法是对于未知胶原蛋白序列的,将不同胶类药材分别采用胰蛋白酶酶切,生成多个肽段的混合物,采用LC-MS进行分析,得到肽图。对肽图进行主成分分析和偏最小二乘法分析,找出差异性的肽段作为目标离子,建立检测方法^[4-7]。

3 研究工作关键点

3.1 肽图的建立

采用胰蛋白酶对胶原蛋白进行酶解。采用LC-MS对酶解肽进行分析,得到LC-MS肽图。采用胰蛋白酶进行酶解,主要目的是:1)鉴于胶原蛋白的同源性,不同动物的胶原蛋白氨基酸序列具有很大的相似性。这种有序列差异的肽段在整个胶原蛋白序列中占的比例比较小。需要用胰蛋白酶将这些比较小的差异肽段酶切出来,突出差异性。2)同时考虑到大分子成分不易在C₁₈色谱柱上分型,将相对分子质量较大的胶原蛋白酶切成相对分子质量较小的肽段,可以采用C₁₈色谱柱进行分析。

3.2 寻找特征肽段

由于在各肽类样品的LC-MS肽图中,成分复杂,数据信息量较大,达到几千个数据点。无法直观的判断出各个胶类的差异。需要借助数学统计分析软件对LC-MS数据进行差异分析^[8-11]。本实验中,

将阿胶、鹿角胶、龟甲胶、黄明胶、新阿胶 5 种胶进行主成分分析(PCA)分析,5 种胶类分别落在不同的区域。说明各个胶类之间是有明显差异。为进一步鉴定各个胶类的差异性成分,利用无监督统计学模型,结合正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)进行二维数据分析。最终找出各个胶类的特征离子,5 种胶类的离子汇总见表 1。

表 1 各个胶类中的特征离子

胶类	皮源	特征离子对
阿胶	驴皮	m/z 539.8(双电荷) $\rightarrow m/z$ 612.4, m/z 923.8
鹿角胶	鹿角	m/z 765.4(双电荷) $\rightarrow m/z$ 554.0, m/z 733.0
龟甲胶	龟甲	m/z 631.3(双电荷) $\rightarrow m/z$ 546.4, m/z 921.4
黄明胶	牛皮	m/z 641.3(双电荷) $\rightarrow m/z$ 726.2, m/z 783.3
新阿胶	猪皮	m/z 774.5(双电荷) $\rightarrow m/z$ 977.8, m/z 1 034.6

4 胶类标准制修订概述

上述离子的特征性只是体现在可以用以区分这 5 种胶类,是相对专属的,而不是绝对专属的。如果增加胶原蛋白序列比对动物的种类,可能这些胶类的特征离子也会变得不具有特征性。但这些相对专属的特征离子已经能够解决目前胶类掺伪造假的质量问题。以这些离子为指标成分,开展了胶类药材质量标准检测项目以及补充检验方法研究。

在质量标准检测项中,主要是 2015 年版《中国药典》收载的阿胶、鹿角胶、龟甲胶的 LC-MS 特征肽鉴别项。鉴别项是对正品应当具有的性质的一种描述。在这 3 个鉴别项中要求必须相应的检出驴皮、鹿角、龟甲的特征离子。

另外,针对掺伪、造假的问题。还建立了一些杂皮检查项补充检验方法。补充检验方法是药品监管部门打击掺伪造假的有利武器。2002 年 9 月 15 日施行的《药品管理法实施条例》(以下简称《条例》)第五十八条规定:“对有掺杂、掺假嫌疑的药品,在国家药品标准规定的检验方法和检验项目不能检验时,药品检验机构可以补充检验方法和检验项目进行药品检验;经国务院药品监督管理部门批准后,使用补充检验方法和检验项目所得出的检验结果,可以作为药品监督管理部门认定药品质量的依据。”这是国家对于药品监管部门提出的具体要求,也是国家药监部门发布“补充检验方法”的法律依据。

自《条例》发布以来,国家药监部门发布的药

品补充检验方法很多。大多数补充检验方法是基于打假需要而订立。而且必须要在市场上出现了某一造假行为,才能发布相应的补充检验方法。因此,关于胶类中掺加杂皮的不同补充检验方法,不是一次性同时发布的,而是在不同时期,根据市场上的掺加行为及相应掺伪产品,开展方法学研究,依次发布的。早在 1996 年,中央电视台就曾曝光过假阿胶事件。时隔多年之后,阿胶造假不仅没有得到遏制,而且越演越烈。2010 年 6 月 6 日中央电视台再度曝光,不法厂家竟然用混了牛皮的下脚料做原料来制阿胶,给使用皮革下脚料的阿胶产品消费者的健康带来威胁。针对牛皮掺伪的情况,国家药监部门开展阿胶专项抽检工作,中国食品药品检定研究院承担了这项工作,并开展相应检测方法的研究,并于 2012 年 4 月 23 日发布了阿胶中牛皮源成分检查项补充检验方法。这个补充检验方法的发布,让阿胶掺加牛皮的行为得到遏制。随后,国家药监部门在 2014 年多次接到某些企业的鹿角胶、龟甲胶中存在掺加阿胶和牛皮的不法行为,针对这种行为,国家局在开展飞行检查的同时,于 2014 年 7 月 17 日又发布了鹿角胶、龟甲胶中驴皮源和牛皮源成分检查项补充检验方法 2 项,有效打击了鹿角胶、龟甲胶中掺加阿胶和牛皮的情况。在 2016 年以后,国家药品监管部门又陆续开展了胶类专项检查、飞行检查等工作,针对阿胶、鹿角胶、龟甲胶中掺加猪皮源成分的不法行为,于 2019 年 7 月 17 日发布了阿胶、鹿角胶、龟甲胶中猪皮源成分检查项补充检验方法 3 项。从上述补充检验方法的发布来看,胶类的质量问题是一个动态发展的过程,随着新的质量问题不断发现,标准也在不断的完善。

在发布的这些补充检验方法中没有规定不得检出杂皮源成分,而是规定了一个检出限度。这种规定也符合中药的特点。自然产出的中药不可能像人工合成的化学药那样达到很高的纯度。其原料在采集、采收的过程中,不可避免地引入杂质,这在历版《中国药典》中也有所体现。在 2015 年版《中国药典》通则 0212 药材和饮片检定通则中规定了药屑杂质通常不得过 3%。另外,“未检出”和“检出”是相对的,当某一杂皮含量很低的样品时,在灵敏度低的仪器上,给出的是未检出杂皮的结果,但用灵敏度高的仪器检测时,可能会给出检出杂皮的结果。因此,检测仪器灵敏度存在差异的情况下,标准中规定一个检出限度就显得更合理。结合市场调

研和检测方法的准确性等方面,规定了杂皮不得超过5%,对于杂皮未超过5%限度的样品,都视为合格产品。

胶类中的补充检验方法在陆续发布以后,对于每个胶类来说,多个补充检验方法并存,大大提高了检测的成本。基于减少检测成本的考虑,在这些方法的研究过程中,均采用了相同的样品处理方法、色谱条件和质谱条件,每个质量标准或补充检验方法,仅仅是检测的目标离子不同。这样,在实际检测中,就可以在相同的检测条件下,同时按多个补充检验方法进行检测。

5 总结与思考

从胶类药材的质量标准研究来看,标准的制定要能够有针对性地解决实际的质量问题。并且标准的研究建立,是针对不同时期的质量问题,不断完善的过程,是动态的过程。标准研究的过程中需要深入基础研究,在标准建立发布的过程中,需要考虑到简单、经济的原则。

胶类药材的研究成果已多次应用于国家局组织的飞行检查、“两打两建”和阿胶、龟甲胶、鹿角胶专项抽检等工作中,在检验实践中起到积极打击掺伪造假的作用,给胶类造假的不法企业很大的威慑。但同时,不法分子可能会用新的杂皮掺入到胶类药材中,规避已经发布的补充检验方法。针对新的质量问题,药监部门又需要继续建立新的补充检验方法来打击新的不法行为,可以说是打假道路无止境。

参考文献

- [1] 程显隆,李文杰,魏锋,等. 动物胶类药材的鉴别方法研究进展[J]. 亚太传统医药,2011,7(3):167-169.
- [2] 翟乙娟,任孝通,都恒青,等. 阿胶、鹿角胶、龟甲胶圆二色谱鉴别[J]. 中药材,1998,21(12):66.
- [3] 巩丽萍,杭宝建,迟连利,等. 马皮特征肽的发现及其在阿胶中马皮源成分检测中的应用[J]. 药物分析杂志,2018,38(2):364-369.
- [4] GUO X H, CHENG X L, LIU W X, et al. Identification of velvet antler and its mixed varieties by UPLC-QTOF-MS combined with principal component analysis [J]. J Pharm Biomed Anal, 2019, 165: 18-23.
- [5] CHENG X L, ZHANG Q Q, LI M H, et al. Identification of four cornua by ultra-performance liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry coupled with principal component analysis [J]. J Sep Sci, 2017, 40(8): 1667-1673.
- [6] CHEN J, CHENG X L, WEI F, et al. Detection of gelatin adulteration in traditional Chinese medicine: analysis of deer-horn glue by rapid-resolution liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry [J/OL]. J Anal Methods Chem, 2015. [2020-03-16]. [http://dx. doi. org/10.1155/2015/259757](http://dx.doi.org/10.1155/2015/259757).
- [7] LIU W X, CHENG X L, GUO X H, et al. Identification of calculus bovis and its mixed varieties by ultra-high-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-Q/TOF-MS) combined with the principal component analysis (PCA) method [J]. J Pharm Biomed Anal, 2020, 179: 112979.
- [8] 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]. J Pharm Biomed Anal, 2012, 62: 191-195.
- [9] CHENG X L, WEI F, CHEN J, et al. Using the doubly charged selected ion coupled with MS/MS fragments monitoring (DCSI-MS/MS) mode for the identification of gelatin species [J/OL]. J Anal Methods Chem, 2014. [2020-03-16]. [http://dx. doi. org/10.1155/2014/764397](http://dx.doi.org/10.1155/2014/764397).
- [10] 程显隆,李文杰,张小龙,等. UPLC-QTOF-MS 结合主成分分析法用于龟甲胶、鹿角胶中添加牛皮成分的检测研究[J]. 药物分析杂志,2012,32(6):931-935.
- [11] 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]. 中国药理学杂志,2015,50(2):104-108.

(收稿日期: 2020-03-16 编辑: 戴玮)