DOI: 10.11895/j.issn.0253-3820.150066

高效液相色谱-同位素稀释质谱法定量分析人生长激素

金有训* 石莲花 武利庆 刘文丽 王 晶
(中国计量科学研究院, 北京 100013)

摘 要 建立了人生长激素(hGH) 纯化分析和高效液相色谱(HPLC) 与同位素稀释质谱(IDMS) 联用高准确度绝对定量方法。采用快速蛋白液相色谱来分离纯化 hGH,以傅里叶变换离子回旋共振质谱仪(FTICR-MS) 准确地测定蛋白质的分子质量。纯化的 hGH 经酸水解后,采用 KINETEX C_{18} 色谱柱为分析柱,以水(含 0.1% 三氟乙酸) 和乙腈为流动相,等梯度分离,流速 0.2 mL/min, 温度 40℃,采用电喷雾正离子模式进行电离,选择多反应监测模式进行检测,内标法定量分析。结果表明,FTICR-MS 所测得的分子量实测值与理论值仅相差 0.31 Da, 脯氨酸、缬氨酸和苯丙氨酸在液相条件下 5 min 内达到基线分离,在最优条件下,hGH 含量测定结果为 186.80 μg/g,相对标准偏差为 0.52%。利用本方法参加国际比对,比对结果与参考值等效一致。本方法具有简易、实用的特点,并且准确可靠,可作为 hGH 纯品标准物质的定值方法,为 hGH 的日常检测提供参考。

关键词 人生长激素; 高效液相色谱; 同位素稀释质谱法; 傅里叶变换离子回旋共振质谱仪; 定量分析

1 引 言

人生长激素(Human growth hormone, hGH) 是由脑垂体前叶嗜酸性细胞分泌的蛋白质,是一种肽类激素,是诊断巨人症、肢端肥大症、遗传性生长激素生成缺陷所致的生长激素缺乏症最常用的指标[1]。

目前,临床检验中针对重组 hGH (rhGH) 的检测方法有酶联免疫法[2,3]、时间分辨荧光免疫分析法[4]、LC-MS/MS 法[5,6]、毛细管电泳结合紫外和质谱技术[7]也为检测 rhGH 滥用后的浓度的差异提供了新途径。但这些方法都是相对测定法,耗时长、费用高、操作复杂。因此,亟需建立具有操作简单,高准确度和高精密度 hGH 的参考测量方法。

目前,纯蛋白的定量方法主要有氨基酸分析[8]、质量平衡[9]、定量核磁[10]、质谱法[11]以及同位素稀释质谱法[12,13]。氨基酸分析法一般在氨基酸分析仪上通过紫外或荧光检测,因此易受干扰,操作比较复杂; 质量平衡法虽然具有高准确度,但其在标准物质定值方面具有一定的局限性; 定量核磁法具有无需待测物对照品、样品预处理步骤简单、测定快速准确、专属性强、不破坏样品等优点,但灵敏度较低; 同位素稀释质谱法具有操作简单,高准确度和高精密度的特点[13]。

本研究采用快速蛋白液相色谱分离纯化 hGH,再采用 SDS-PAGE 和超高分辨能力 FTICR 对 hGH 进行纯度表征和分子量测定,为蛋白质结构的鉴定奠定基础。采用 KINETEX C_{18} 色谱柱在 5 min 内快速分离 3 种氨基酸(脯氨酸、缬氨酸和苯丙氨酸) 。本方法具有操作简易、分析速度快、重现性较好、实用性强等特点,并且准确可靠。以此为基础建立了 hGH 的 HPLC-IDMS 联用高准确度绝对定量方法。

2 实验部分

2.1 仪器、试剂与样品

Qtrap 5500(美国 AB 公司) ; Agilent 1200(美国安捷伦公司) ; 垂直电泳槽(美国伯乐公司) ; AKTA purifier (美国 GE 公司) ; 12 T-FTICR 高分辨率质谱仪(美国 Bruker 公司) ; ME235S 型天平(感量 0.01 mg,德国 Satorius 公司) ; RC10-22T 型离心干燥机(美国 Thermo 公司) ; UFE500 烘箱(德国 Memmert 公司) ; 移液器(10 μL,20 μL,100 μL,200 μL,1000 μL,法国 Gilson 公司) ; 美国 Milli-Q 超纯水系统。

标记氨基酸($^{13}C_5$-脯氨酸、$^{13}C_5$-缬氨酸、$^{13}C_9$-苯丙氨酸,美国剑桥同位素实验室) ; 脯氨酸(GBW(E)

2015-01-21 收稿; 2015-04-28 接受
本文系中国计量科学研究院国际比对专项项目(2013-25) 资助
* E-mail: jinyx@nim.ac.cn

100084,Pro)、缬氨酸(GBW(E)100055,Val)、苯丙氨酸(GBW(E)100061,Phe)国家标准物质(中国计量科学研究院);hGH(安徽安科生物工程股份有限公司);三氟乙酸(TFA,中国 DikmaPure 公司);乙腈(美国 J. T Baker 公司);蛋白质预制胶(7 × 8 cm,胶厚 1.0 mm,美国伯乐公司);10 × SDS 缓冲溶液(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司);彩虹预染宽分子量蛋白 Marker(10 ~ 260 kDa,中国中科瑞泰公司);其它试剂均为分析纯。实验用水为 Milli-Q 超纯水。

2.2　hGH 纯化

将 1 mg hGH 溶于 1 mL 水中,经 0.45 μm 滤膜过滤。将 1 mg/mL hGH 溶液,用 AKTA purifier HPLC 系统的 Jupiter C_4 色谱柱(150 mm × 4.6 mm,5 μm,Phenomenex,USA)分离,柱温设为 60℃;流动相 A: H_2O(含0.1% TFA)和流动相 B: CH_3CN(含0.1% TFA),流速为 1 mL/min,紫外检测器波长 215 nm,分析时间 30 min,进行梯度洗脱,收集洗脱峰;收集的洗脱峰浓缩干燥后用 0.1% 甲酸复溶,进行蛋白质分子量及纯度的鉴定。

2.3　hGH 基本性质表征

2.3.1　SDS-PAGE 纯度测定　冷冻干燥后,用洗脱峰收集液鉴定蛋白纯度。分析条件:在垂直电泳槽内放入蛋白质预制胶,并加入 1 × 电泳缓冲液,使其被充分浸泡。在 1.5 mL 离心管中以体积比 50∶20 加入 hGH 样品和上样缓冲液,然后在 100℃水浴锅中煮沸 5 min,取出静置。从 -20℃取出 Bio-Rad 双色蛋白 Marker,放至室温,离心待用。在蛋白预制胶的每个孔中上样 10 μL,电泳分析。电泳条件为电压 100 V,分离时间为 90 min。分析结束后剥离凝胶用考马斯亮蓝染色 1 h,加脱色液(水-甲醇-冰醋酸,5∶4∶1,*V/V/V*)过夜脱色。

2.3.2　FTICR-MS 分子量测定　FTICR-MS 配有 12.0 T 超导磁体和电喷雾离子化源(ESI^+),检测范围 *m/z* 200 ~ 3000。冷冻干燥后的纯化蛋白用 0.1% 甲酸配制 0.1 mg/mL hGH 溶液,取 500 μL hGH 溶液,泵流速 10 μL/min,数据采集内存 2 M,256 次扫描,内标质量校正。分子量平行测定 6 次。

2.4　HPLC-IDMS 法测定 hGH 蛋白质含量

2.4.1　标准溶液配制　准确称取 10 mg 脯氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸标准物质(准确至 0.00001 g),分别溶于 10 mL 1% 甲酸中,配制成标准工作溶液,使用时用 1% 甲酸稀释 10 倍后使用。

准确称取 10 mg 同位素标记脯氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸(准确至 0.00001 g),分别溶于 10 mL 1% 甲酸-水中,配制成标记标准储备液。

同时配制脯氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸含量与样品中脯氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸含量接近(约 1∶1)的标准溶液,经 0.22 μm 滤膜过滤后,用 HPLC-MS 分析。

2.4.2　hGH 样品的水解　称取 hGH 样品约 10 mg,溶于 10 mL 水中,配成 1 mg/mL hGH 溶液。分别取 200 μL hGH 溶液和标记氨基酸混合标准溶液,加到 2 mL 安瓿瓶中,真空离心干燥 30 min,取出后加入 500 μL 6 mol/L HCl,通氮 2 min 除氧后密封,在 110℃的烘箱中进行水解,每隔 12 h 涡旋混匀 1 次。水解后用氮气吹干,用 500 μL 0.1% HCl 复溶,经 0.22 μm 滤膜过滤后进行测定。

2.4.3　HPLC-IDMS 分析　采用 KINETEX C_{18} 色谱柱(150 mm × 2 mm I. D.,2.6 μm;美国 Phenomenex 公司)。以 0.1% TFA-乙腈(90∶10,*V/V*)等梯度洗脱 5 min,流速 200 μL/min。质谱仪喷雾电压 5.0 kV;壳气流速 2 MPa;辅助气流速 0.5 MPa;干燥气温度 550℃;碰撞能力 25。采用多反应检测模式(MRM),分别监测如下离子反应对:脯氨酸:116 -> 70(Pro),121 -> 74(标记 Pro);缬氨酸:118 -> 72(Val),123 -> 76(标记 Val);苯丙氨酸:166 -> 120(Phe),175 -> 128(标记 Phe)。

3　结果与讨论

3.1　hGH 基本性质的表征

3.1.1　hGH 反相液相分离纯化结果　hGH 蛋白样品用 Jupiter C4 分析柱进行分离纯化的结果见图 1,SDS-PAGE 电泳纯度测定结果见图 2,发现 1 号峰和 2 号峰正是相对分子质量约为 21.5 kDa 的蛋白。

3.1.2　FTICR-MS 分子量测定结果　傅里叶变换离子回旋共振质谱仪是一种具有超高分辨能力、高质量准确度、高扫描速度等性能的仪器[14]。峰 2 的 FTICR-MS 谱图见图 3。图 3a 为电喷雾离子源正离

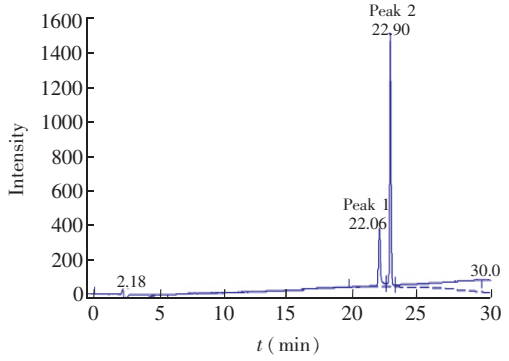

图1 含有 hGH 样品的分离纯化结果

Fig. 1 Separation and purification results of human growth hormone (hGH) sample

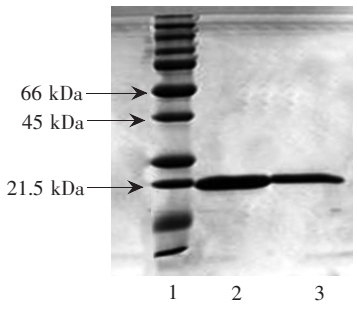

图2 纯品 hGH 的 SDS-PAGE 结果

Fig. 2 SDS-PAGE results of pure hGH

1. Bio-rad marker; 2. 2 号峰对应的蛋白样品; 3. 1 号峰对应的蛋白样品。

1. Bio-rad marker; 2. peak 2 corresponding protein sample; 3. peak 1 corresponding protein sample.

子模式下获得的多离子峰,图 3b 为去卷积后所得到的蛋白质分子量,实测值22125.38 Da与hGH理论分子质量 22125.07 Da 仅相差 0.31 Da。峰 1 的 FTICR-MS 谱图见图 4。图 4a 为电喷雾离子源正离子模式下获得的多离子峰,图 4b 为去卷积后所得到的蛋白质分子量,实测值 22140.62 Da 与 hGH 氧化的理论分子质量 22140.05 Da 仅相差 0.57 Da。说明 FTICR-MS 可以快速准确地获得蛋白质的分子质量信息。

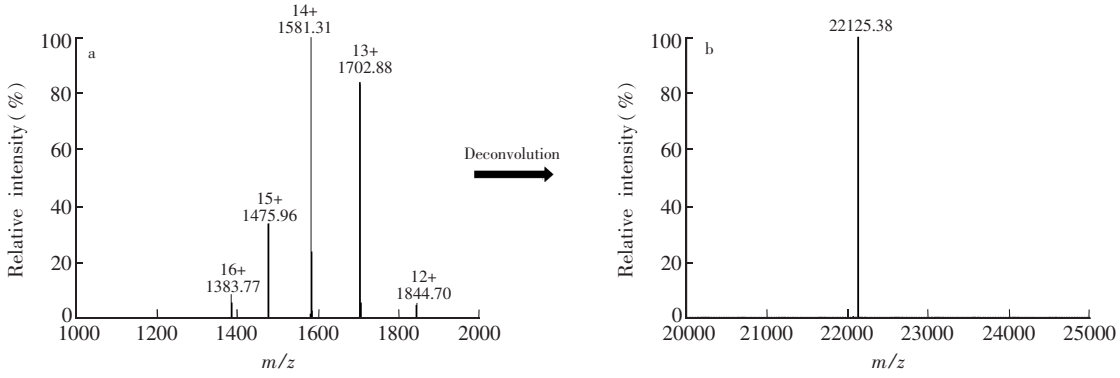

图3 2 号峰对应的蛋白样品的 ESI^+ FTICR-MS 谱图

Fig. 3 Positive-ion ESI FTICR-mass spectrum of protein sample corresponding peak 2

FTICR: Fourier trasform ion cyclotron resonance.

3.2 hGH 含量 HPLC-IDMS 测定结果

3.2.1 纯品 hGH 酸水解时间优化结果 为保证 hGH 能够定量的水解成氨基酸,需要优化水解时间,选取水解时间曲线的最高点或平台期作为最佳的水解时间。分别考察了水解时间为 12, 24, 48, 72 和 96 h,水解后的溶液中 Pro, Val 和 Phe 对标记的 Pro, Val 和 Phe 的相对比例,确定合适的水解时间。如图 5 所示,当水解时间为 48 h 时,3 种氨基酸的相对比例都达到了较稳定的平台期,因此选定 48 h 为 hGH 的最佳水解时间。图 6 为 3 种氨基酸在 HPLC-MS/MS 的分离色谱图,5 min 内可快速分离 3 种氨基酸,Pro, Val 和 Phe 的保留时间分别为 1.61, 1.93 和 4.09 min。

3.2.2 HPLC-IDMS 绝对定量 hGH 目前,对蛋白质的绝对定量研究主要集中在同位素稀释质谱法(IDMS),IDMS 法具有操作简单,准确度和精密度高的特点。本方法通过测氨基酸来定量分析蛋白质的含量。HPLC-IDMS 法绝对定量 hGH 蛋白质浓度结果见表 1。从表 1 可见,HPLC-IDMS 法的重复性好,hGH 蛋白质浓度的 RSD 为 0.5% ($n=3$),因此本方法可通过测定高丰度、高稳定性的氨基酸定量分析蛋白质含量,精密度与再现性较好。利用本方法参加国际比对,本实验室的数据与日本计量院

NMIJ、

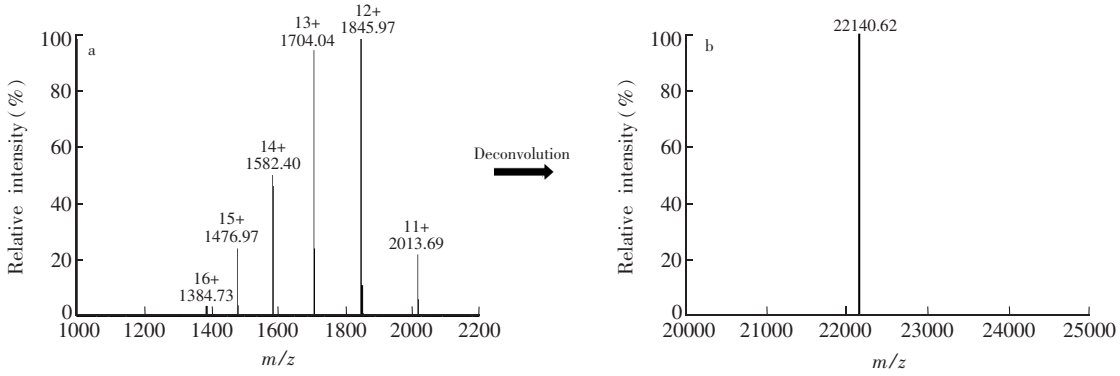

图 4　1 号峰对应的蛋白样品的 ESI^+ FTICR-MS 谱图

Fig. 4　Positive-ion ESI FTICR-mass spectrum of protein sample corresponding peak 1

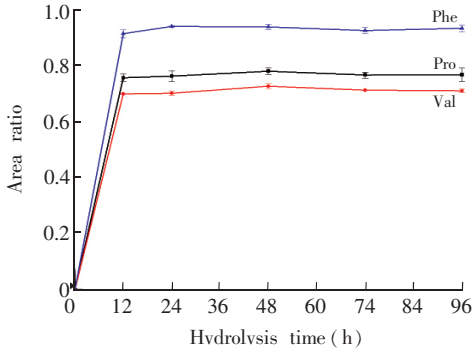

图 5　纯品 hGH 水解时间优化结果

Fig. 5　Optimial results of hGH hydrolysis time

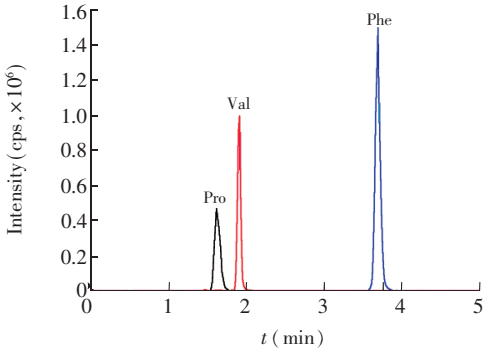

图 6　3 种标准氨基酸的多反应检测模式(MRM)色谱图

Fig. 6　Typical MRM chromatograms of three amino acids standard

韩国标准科学研究院 KRISS 的数据都比较接近，验证了所建方法的可行性，为血清中蛋白及其它基体样品中蛋白的定量分析提供了新的思路和手段。

表 1　HPLC-IDMS 绝对定量 hGH 蛋白质结果

Table 1　Results of absolute quantitative analysis of hGH proteins by HPLC-isotope dilution MS (IDMS)

氨基酸含量 Absolute quantity of amino acids (μg)						蛋白质浓度 hGH concentration (μg/g)			
Proline	Average	Valine	Average	Phenylalanine	Average	Proline	Valine	Phenylalanine	Average
664.61		582.53		1077.95					
655.26	659.94	581.53	583.39	1082.90	1080.16	185.71	187.63	187.06	186.80 ± 0.99
659.95		586.12		1079.62					

分析结果表示为平均值 ± 标准偏差($n = 3$)。

Data represent mean ± S. D. of hGH (μg/g) of triplicate measurements.

References

1　BAO Jian-Hua. *Pharm. Care & Res.*, **2008**, 8(4): 272 – 275

包建华. 药学服务与研究, 2008, 8(4): 272 – 275

2　Moura J F, DeLacerda L, Sandrini R, Borba F M, Castelo D N, Sade E R, Sella S, Minozzo J C, Callefe L G, Figueiredo B C. *J. Biomed. Biotechnol.*, **2004**, 2004(3): 143 – 149

3　Healy M L, Dall R, Gibney J, Bassett E, Ehrnborg C, Pentecost C, Rosen T, Cittadini A, Baxter R C, Sönksen P H. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **2005**, 90(2): 641 – 649

4　Bidlingmaier M, Strasburger C J. *Pituitary*, **2007**, 10(2): 115 – 119

5 Kirsch S, Widart J, Louette J, Focant J F, De Pauw E. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1153(1-2): 300 - 306
6 Jung C, Lee Y P, Jeong Y R, Kim J Y, Kim Y H, Kim H S. *J. Chromatogr. B*, **2005**, 814(1): 53 - 59
7 Catai J R, Sastre Toraño J, Jongen P M, de Jong G J, Somsen G W. *J. Chromatogr. B*, **2007**, 852(1-2): 160 - 166
8 CHANG Bi-Ying, LIANG Dong-Shen, YAN Hui-Wen, ZUO Jiang-Wan. *Chinese J. Anal. Chem.*, **1993**, 21(10): 1220 - 1227
常碧影, 梁冬生, 阎惠文, 左江湾. 分析化学, 1993, 21(10): 1220 - 1227
9 DAI Xin-Hua, BAO Hai-Xia, SU Fu-Hai, FANG Xiang, HUANG Ting, ZHANG Wei, LI Hong-Mei, WANG Hai-Feng. *Measurement Technique.*, **2013**, (10): 15 - 19
戴新华, 暴海霞, 苏福海, 方 向, 黄 挺, 张 伟, 李红梅, 王海峰. 计量技术, 2013, (10): 15 - 19
10 HUANG Ting, ZHANG Wei, QUAN Can, LI Hong-Mei. *Chemical Reagent*, **2012**, 34(4): 327 - 332
黄 挺, 张 伟, 全 灿, 李红梅. 化学试剂, 2012, 34(4): 327 - 332
11 ZHANG Wei. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2014**, 42(12): 1859 - 1868
张 伟. 分析化学, 2014, 42(12): 1859 - 1868
12 ZHANG Dan, FENG Liu-Xing, WANG Jun, SHEN Dai-Rui, XIONG Jin-Ping. *Chem. J. Chinese Universities*, **2014**, 35(9): 1896 - 1900
张 丹, 冯流星, 王 军, 申黛瑞, 熊金平. 高等学校化学学报, 2014, 35(9): 1896 - 1900
13 Muñoz A, Kral R, Schimmel H. *Anal. Biochem.*, **2011**, 408(1): 124 - 131
14 Wu S L, Jardine I, Hancock W S, Karger B L. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2004**, 18(19): 2201 - 2207

Absolute Quantification of Human Growth Hormone by Isotope Dilution-High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

JIN You-Xun*, SHI Lian-Hua, WU Li-Qing, LIU Wen-Li, WANG Jing
(*National Institute of Metrology, Beijing* 100013, *China*)

Abstract A method was developed for the quantification of human growth hormone (hGH) by protein purification and isotope dilution-high performance liquid chromatography mass spectrometry (HPLC-IDMS). The hGH was purified and fractionated by fast protein liquid chromatography (FPLC), then hGH molecular weight was accurately determined by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (FTICR-MS). The purified hGH was hydrolyzed and the separation was performed on an KINETEX C_{18} column (150 mm × 2 mm I. D., 2.6 μm) with water (containing 0.1% TFA) and acetonitrile isocratic solution as the mobile phase at a flow rate of 0.2 mL/min and 40℃. The electrospray source was operated in the positive ion mode, and monitored in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. The measured hGH molecular weight by FTICR-MS was only 0.31 Da difference from theoretical value. Three amino (proline, valine and phenylalanine) were clearly separated by isocratic elution within 5 min. Under the optimized conditions, the content of hGH was 186.80 μg/g with a RSD of 0.5%. The detection results of hGH in international comparison by this method were consistent with the reference value, which validated the feasibility of the established method. The developed method is simple, practical, accurate, reliable and reproducible, and can be used for the hGH quantitation of pure hGH CRM to provide reference for the routine detection of hGH.

Keywords Human growth hormone; High performance liquid chromatography; Isotope dilution mass spectrometry; Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer; Quantitation

(Received 21 January 2015; accepted 28 April 2015)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 8130318).