

## 高效液相色谱-质谱联用测定胶原蛋白中的羟脯氨酸

夏金根, 陈波, 姚守拙

(化学生物学及中药分析教育部重点实验室 湖南师范大学, 湖南 长沙 410081)

**摘要** :建立了一种简单、快速地测定胶原蛋白中羟脯氨酸(HYP)的高效液相色谱-电喷雾质谱(HPLC-ESI/MS)方法。胶原蛋白经酸水解后,以乙腈-0.05%的三氟乙酸水溶液(体积比为5:95)为流动相,以1.0 mL/min的流速在C<sub>8</sub>反相柱上进行分离。以茶氨酸为内标,利用质谱定性定量测定HYP。在电喷雾正离子模式下,对 $m/z$  132和 $m/z$  175离子进行选择离子监测。在11.7~117 mg/L范围内,HYP与内标物茶氨酸的峰面积比和HYP的质量浓度呈良好的线性关系,相关系数为0.999 3。含量测定的相对标准偏差为1.87%,回收率为97.85%~101.76%。此方法流动相简单,分析时间短且无需衍生处理,抗干扰能力强,能准确快速地测定胶原蛋白中HYP的含量。

**关键词** :高效液相色谱-质谱;羟脯氨酸;胶原蛋白

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2008)05-0595-04 栏目类别 :研究论文

## Determination of hydroxyproline in collagenous proteins by high performance liquid chromatography-mass spectrometry

XIA Jingen, CHEN Bo, YAO Shouzhao

(Key Laboratory of Chemical Biology and Traditional Chinese Medicine Research of Ministry of Education, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

**Abstract** : A simple, rapid and accurate method for the determination of hydroxyproline in collagenous proteins by high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry (HPLC-ESI/MS) was developed. After hydrolysis of collagenous proteins with hydrochloric acid, the hydroxyproline was separated on a Spherigel C<sub>8</sub> column using acetonitrile-0.05% trifluoroacetic acid aqueous solution (5:95, v/v) at a flow rate of 1.0 mL/min. Theanine was used as the internal standard for the quantification. Hydroxyproline was identified and quantified by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), which was operated in positive ion mode while the  $m/z$  132 and  $m/z$  175 ions were recorded in the selective ion monitoring (SIM) mode. The peak area ratio of hydroxyproline to theanine versus the hydroxyproline concentration was linear over a concentration range of 11.7 - 117 mg/L for hydroxyproline. The correlation coefficient was 0.999 3. The reproducibility and average recovery of the method were 1.87% and 98.85% respectively. The method has the advantages of easy operation, without derivatization, less analysis time, good precision and accuracy.

**Key words** : high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS); hydroxyproline; collagenous proteins

羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)是一种亚氨基酸,通常在脯氨酸的第4位上带有羟基(见图1),但有时也在第3位上。HYP是胶原蛋白的主要组成成分,不属于20种常见的氨基酸<sup>[1]</sup>。HYP约占胶原蛋白中氨基酸总量的10%,而在其他蛋白质中含量甚微,这使得它几乎成为胶原蛋白所特有的成分,因而可通过测定HYP含量来计算胶原蛋白的含

量,从而确定胶原蛋白的总体水平<sup>[2]</sup>。

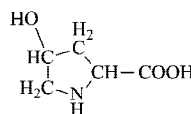


图1 4-羟脯氨酸的结构式

Fig. 1 Structure of 4-hydroxyproline

羟脯氨酸的传统测定方法是氯胺 T 法<sup>[3,4]</sup>,其基本原理是:先把含有 HYP 多肽的蛋白质、组织、血清、腹水或尿液等水解成游离的 HYP,游离的 HYP 被氧化后再与对二甲氨基苯甲醛(PDAB)在一定温度下发生反应,生成红色的吡咯化合物,最后通过分光光度计比色或其他的方法检测出水解液中 HYP 的含量。氯胺 T 法的特异性差,灵敏度低,影响因素较多,目前研究及应用的已不多。

近年来,柱前衍生高效液相色谱法测定 HYP 的报道较多,但衍生步骤比较繁琐,衍生条件限制较多<sup>[5,6]</sup>,而且影响检测的准确性,从而限制了其发展前景。另外,也有在 200 nm 波长下直接检测出氨基酸的报道<sup>[2]</sup>,但检测灵敏度较低,杂质峰干扰较大。与其他技术相比,高效液相色谱-电喷雾质谱联用技术(HPLC-ESI/MS)可以提供丰富的结构信息,显著提高了检测的准确度、灵敏度,操作简单<sup>[7,8]</sup>。但利用 HPLC-ESI/MS 技术测定胶原蛋白中 HYP 含量的文献报道甚少。我们采用此法测定了胶原蛋白中的 HYP,充分利用了液相色谱的分离能力和质谱的定性定量能力,节省了样品的处理时间和分析时间。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Waters 2695 分离单元,配有自动进样器;Waters Micromass ZQ 2000 质谱检测器,配有电喷雾电离源(ESI);AL204 电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);MTN-2800D 型氮吹仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

L-羟脯氨酸标准品(纯度 $\geq 98.5\%$ ,杰辉生物技术有限公司),L-亮氨酸标准品(纯度 $\geq 98.0\%$ ,上海源聚生物科技有限公司),L-异亮氨酸标准品(纯度 $\geq 98.0\%$ ,天津市光复精细化工研究所),L-精氨酸标准品(纯度 $\geq 98.5\%$ ,杰辉生物技术有限公司),茶氨酸标准品(纯度 $\geq 99.0\%$ ,进口);胶原蛋白美白胶囊(广东威士雅保健品有限公司);三氟乙酸(进口),乙腈、甲醇为色谱纯,盐酸为分析纯;纯净水用 Millipore 公司的 Milli-Q 纯水系统(Bedford, MA)制得。

### 1.2 液相色谱-质谱条件

#### 1.2.1 液相色谱条件

色谱柱为 Spherigel C<sub>8</sub> 柱(200 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m,大连江申分离科学科技公司);流动相为乙腈-0.05% 三氟乙酸水溶液(体积比为 5:95),流速为 1.0 mL/min,柱温为室温,进样体积为 10  $\mu$ L,以 0.2 mL/min 的分流速度进质谱检测器。

#### 1.2.2 质谱条件

离子源:ESI,电喷雾离子化正离子采集模式(ESI<sup>+</sup>);质量扫描范围:40~300 u;毛细管电压:3.5 kV;锥孔电压:25 V;萃取电压:4.0 V;射频电压:0.5 V;源温度:103  $^{\circ}$ C;脱溶剂温度:300  $^{\circ}$ C;脱溶剂气速度:280 L/h;锥孔反吹气速度:60 L/h;选择离子监测模式(SIM),选择离子为  $m/z$  132 和  $m/z$  175。

### 1.3 标准溶液的配制

精密称取 58.5 mg HYP 标准品于 50 mL 容量瓶中,加水溶解定容,得 1.17 g/L 的标准储备液。精密称取 20.1 mg 茶氨酸标准品于 50 mL 容量瓶中,加水溶解定容,得 0.402 g/L 的内标物溶液。精密吸取不同体积的标准溶液,加入相同体积的内标物溶液,适量稀释至 HYP 的质量浓度分别为 11.7, 29.25, 58.5, 87.75 和 117 mg/L 的标准系列溶液(其中内标物茶氨酸的质量浓度为 80.4 mg/L)。

### 1.4 样品处理

取胶原蛋白美容胶囊 5 粒,去壳、混匀,精密称取 0.0520 g,加 6 mol/L 盐酸-0.5% 苯酚溶液 10 mL,真空封管,于 110  $^{\circ}$ C 下水解 24 h,挥干溶剂<sup>[9,10]</sup>,加水溶解,加入内标物溶液 5 mL,加水定容至 25 mL,过 0.45  $\mu$ m 纤维素微孔滤膜,滤液直接进入高效液相色谱/质谱仪检测。

## 2 结果与讨论

### 2.1 流动相和内标物的选择

胶原蛋白水解之后生成多种氨基酸,其中亮氨酸和异亮氨酸的相对分子质量( $M_r$ )与 HYP 的  $M_r$  都为 131,其准分子离子峰  $m/z$  都为 132,故需排除以上两种氨基酸的干扰。本文分别采用不同比例的乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.05% 甲酸水溶液、乙腈-0.05% 三氟乙酸水溶液对 HYP(50 mg/L)、亮氨酸(50 mg/L)和异亮氨酸(25 mg/L)标准溶液进行等度洗脱,意在对此 3 种氨基酸进行色谱分离,消除干扰。结果表明,当流动相为乙腈-水、乙腈-0.05% 甲酸水溶液和乙腈-0.05% 三氟乙酸水溶液(体积比均为 5:95)时,上述 3 种氨基酸均能达到基线分离。流动相为乙腈-0.05% 三氟乙酸水溶液(体积比为 5:95)时上述 3 种氨基酸的 SIM 色谱图见图 2。

质谱多采用内标法进行定量测定。茶氨酸是茶叶中特有的游离氨基酸,不存在于胶原蛋白中,因此本实验选用茶氨酸作为定量内标。同时,考虑到样品水解液中可能存在精氨酸,而精氨酸的  $M_r$  与内标物茶氨酸的  $M_r$  均为 174,其准分子离子峰  $m/z$  都为 175。在相同的液相色谱条件下,用上述 3 种

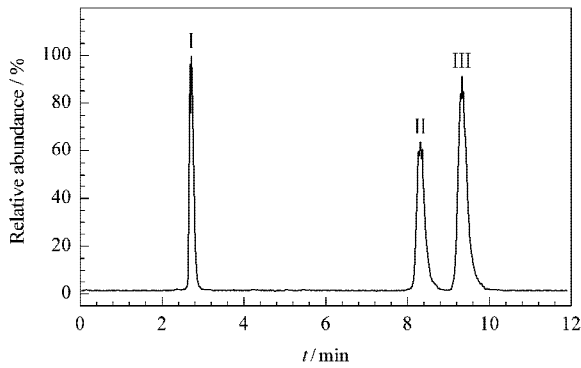


图 2 ( I )羟脯氨酸、( II )亮氨酸和( III )异亮氨酸的选择离子  $m/z$  132 的质量色谱图

Fig. 2 Mass chromatogram ( $m/z$  132) of ( I ) hydroxyproline, ( II ) leucine and ( III ) isoleucine

流动相对茶氨酸( 80 mg/L)和精氨酸( 50 mg/L)进行洗脱,发现当流动相为乙腈-0.05% 三氟乙酸水溶液( 体积比为 5:95)时,茶氨酸与精氨酸能达到较好的分离( 见图 3)。

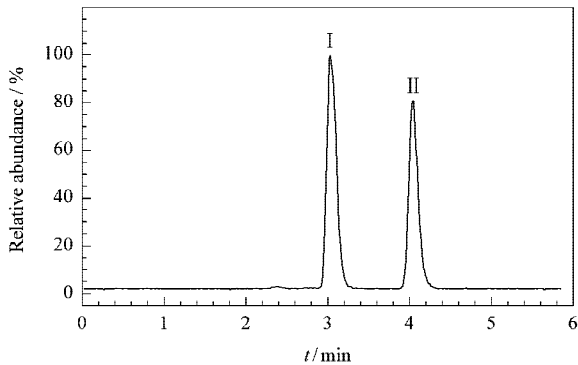


图 3 ( I )精氨酸和( II )茶氨酸的选择离子  $m/z$  175 的质量色谱图

Fig. 3 Mass chromatogram ( $m/z$  175) of ( I ) arginine and ( II ) theanine

胶原蛋白水解后主要含有各种氨基酸,用质谱定性定量检测 HYP 时,只需考虑与其  $M_r$  相同的氨基酸,其他氨基酸的影响很小。每次样品处理完后,用 3~4 倍柱容量的乙腈-0.05% 三氟乙酸水溶液( 体积比为 90:10)冲洗色谱柱,使其回到初始条件,避免非极性物质对色谱柱及质谱检测器的影响。

## 2.2 质谱条件的优化

为了得到 HYP 的最佳质谱响应,提高其灵敏度,实验中利用流动注射法( flow injection analysis, FIA)对其质谱参数进行优化。由于 HYP 的结构中既有亚氨基又有羧基,因此正离子模式和负离子模式下都应有较好的响应。但经过实验比较,发现其在正离子模式下的响应更好。根据各质谱参数对 HYP 响应和裂解方式的影响情况,主要对锥孔电压进行了调节。本实验考察了在 10,15,20,25,30

和 35 V 的锥孔电压下 HYP 的响应信号。结果表明,锥孔电压为 30 V 时, HYP 的响应值达到最大;超过 30 V 后,其响应信号反而减小,碎片离子增加。适当调节其他质谱条件进一步优化,最后确定了“1.2.2”节所述的质谱条件。

在优化的质谱条件下, HYP 标准品( 50 mg/L)的质谱图见图 4-a,  $m/z$  132 为其准分子离子  $[M + H]^+$ 。茶氨酸标准品( 80 mg/L)的质谱图见图 4-b,  $m/z$  175 为其准分子离子  $[M + H]^+$ 。

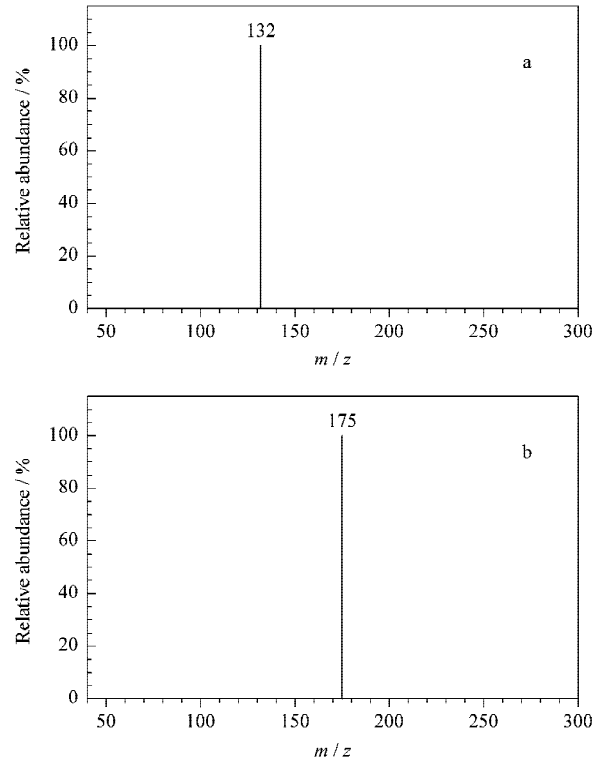


图 4 ( a )羟脯氨酸和( b )茶氨酸的选择离子质谱图

Fig. 4 SIM mass spectra of ( a ) hydroxyproline and ( b ) theanine

## 2.3 线性关系、检出限和定量限

对加有内标的一系列浓度的 HYP 标准溶液进行检测,每个浓度的试样平行分析 3 次,用 HYP 与茶氨酸峰面积比的平均值( $Y$ )对 HYP 质量浓度( $X$ , mg/L)做标准曲线,得到线性方程: $Y = 0.027X - 0.011$ ,  $r = 0.9993$ ,线性范围为 11.7~117 mg/L。

将 HYP 标准溶液逐级稀释后,测得最低检出限为 0.7  $\mu\text{g/L}$  ( $S/N = 3$ ),最低定量限为 2.3  $\mu\text{g/L}$  ( $S/N = 10$ )。

## 2.4 重现性实验

平行称取样品粉末 5 份,按“1.4”节方法进行处理后测定, HYP 含量测定结果的相对标准偏差(RSD)为 1.87%。

## 2.5 加样回收率试验

平行称取胶原蛋白美容胶囊粉末 3 份,每份约

30 mg(其中 HYP 的质量分数为 3.63%,约为 1.1 mg)。分别加入 117 mg/L HYP 标准溶液 5,10,15 mL,按“1.4”节所述处理后进行回收试验。每个试样平行处理 5 份,可得低、中、高加标水平下的平均回收率( $n=5$ )分别为 98.5%(RSD=1.23%),97.9%(RSD=1.92%)和 101.8%(RSD=2.01%)。

## 2.6 样品分析

内标物茶氨酸(80 mg/L)的选择离子( $m/z$  175)的质量色谱图见图 5-a。实际样品(HYP 的质量浓度约为 75 mg/L)和加内标(茶氨酸的质量浓度约为 80 mg/L)后该样品的选择离子( $m/z$  132, 175)的质量色谱图分别见图 5-b 和图 5-c。

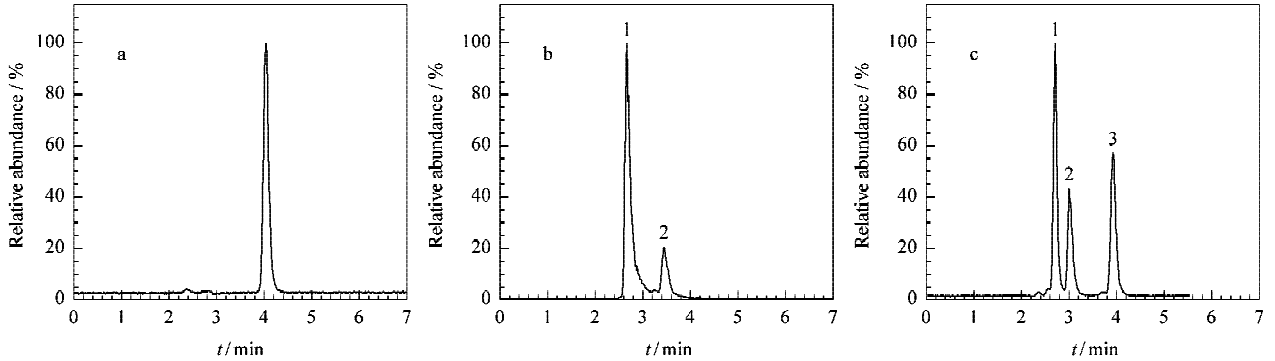


图 5 (a)茶氨酸的选择离子( $m/z$  175)、(b)实际样品的选择离子( $m/z$  132, 175)和 (c)添加内标的实际样品的选择离子( $m/z$  132, 175)的质量色谱图

Fig. 5 SIM chromatograms of (a) theanine ( $m/z$  175), (b) a real sample ( $m/z$  132, 175) and (c) the sample spiked with theanine ( $m/z$  132, 175)

1. hydroxyproline; 2. arginine; 3. theanine.

## 3 结语

本文采用高效液相色谱-质谱联用的方法测定胶原蛋白中 HYP 的含量。该方法的流动相简单,分析时间短,且无需对样品进行衍生,操作简便,定量准确,重现性好,抗干扰能力强,可以用于实际样品的测定。

## 参考文献:

- [1] Zhang Z Q, Zhao D X, Yang X L. Amino Acids & Biotic Resources (张自强, 赵东旭, 杨新林. 氨基酸和生物资源), 2006, 28(1): 55
- [2] Zou X L, Li Y Q, Zeng H Y, et al. Chinese Journal of Chromatography (邹晓莉, 黎源倩, 曾红燕, 等. 色谱), 2006, 24(3): 263
- [3] Wei D, Chen W H. Modern Journal of Integrated Traditional

Chinese and Western Medicine (魏东, 陈文慧. 现代中西医结合杂志), 2005, 14(18): 2479

- [4] Zhang J J, Zeng Q X. Food Science and Technology (张俊杰, 曾庆孝. 食品科技), 2004(4): 83
- [5] Tian J, Lü J. China Pharmacy (田静, 吕坚. 中国药房), 2003, 14(3): 145
- [6] Tang Z Y, Xiao L Y, Li H. Shaanxi Journal of Medical Laboratory Sciences (唐志毅, 肖路延, 李红. 陕西医学检验), 1999, 14(2): 3
- [7] Wang Y H, Feng J L, Pan Z Q, et al. Chinese Journal of Health Laboratory Technology (王一红, 冯家力, 潘振球, 等. 中国卫生检验杂志), 2006, 16(2): 161
- [8] Jander G, Norris S R, Joshi V, et al. Plant J, 2004, 39: 465
- [9] Ding Y Y, Xie M X, Kang J. Chinese Journal of Analytical Chemistry (丁雅韵, 谢孟峡, 康娟. 分析化学), 2002, 30(4): 418
- [10] Miao H, Yang T, Huo J S, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (苗虹, 杨涛, 霍君生, 等. 分析化学), 2000, 28(9): 1091