

液相色谱-串联质谱法测定保健品中 *L*-羟脯氨酸含量

蔡伟江*, 陈晓霞

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

摘要: **目的** 通过优化保健品中 *L*-羟脯氨酸的测定条件, 建立保健品中 *L*-羟脯氨酸的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)定量检测的分析方法。**方法** 采用酸水解的方法处理 *L*-羟脯氨酸, 色谱柱(EC-C₁₈, 4.6 mm×50 mm, 2.7 μm), 流动相为水相和乙腈按一定的梯度进行洗脱, 流速0.5 mL/min, 采用LC-MS/MS在正离子模式下检测, 外标法定量。**结果** LC-MS/MS法在0.00284 mg/mL~0.0284 mg/mL范围内, *L*-羟脯氨酸的浓度和峰面积的线性良好, 相关系数 $R^2 > 0.99$, 方法的检出限和定量限分别为1.42 μg/g和4.7 μg/g, 放置24 h内 *L*-羟脯氨酸的稳定性良好, 在不同添加水平下, 方法的回收率范围为95.0%~98.8%, 相对标准偏差为1.7%($n=9$)。**结论** 高效液相色谱-串联质谱法灵敏度高、准确、重现性好, 适用于保健品中 *L*-羟脯氨酸的含量测定。

关键词: *L*-羟脯氨酸; 保健品; 液相色谱-串联质谱法; 含量测定

Determination of *L*-hydroxyproline content in health products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

CAI Wei-Jiang*, CHEN Xiao-Xia

(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

ABSTRACT: Objective By optimizing the determination conditions of *L*-hydroxyproline in health foods, to establish a method for quantitative determination of *L*-hydroxyproline by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Methods** *L*-hydroxyproline was of acid hydrolysis and chromatographic analysis was performed on column (EC-C₁₈, 4.6 mm × 50 mm, 2.7 μm) eluted with an acetonitrile-water flow rate of 0.5 mL/min, which was detected by LC-MS/MS in the positive ion mode and quantified by external standard method. **Results** The linear relationship between *L*-hydroxyproline concentration and peak area were good within 0.00284~0.0284 mg/mL range, $R^2 > 0.99$, the detection limit and the limits of quantification were 1.42 μg/g and 4.7 μg/g, with a good stability of *L*-hydroxyproline within 24 h, and the recovery of different adding levels was 95.0%~98.8%, and the relative standard deviation was 1.7% ($n=9$). **Conclusion** High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method is sensitive, accurate, reproducible, and applicable to the determination of *L*-hydroxyproline content in health foods.

KEY WORDS: *L*-hydroxyproline; health care products; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; content determination

*通讯作者: 蔡伟江, 中药师, 主要研究方向为保健食品的质量检测。E-mail: 714524253@qq.com

*Corresponding author: CAI Wei-Jiang, Herbalists, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: 714524253@qq.com

1 引言

L-羟脯氨酸是一种亚氨基酸,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^[1]。为白色片状结晶性或结晶性粉末,呈苦味中的独特甜味,能改善果汁饮料、清凉饮料等的风味的味质。有特殊风味,可作香原料。分子式: C₅H₉NO₃, 分子量 131.13。熔点 274 °C。易溶于水,微溶于乙醇。*L*-羟脯氨酸是胶原蛋白的主要成分,由测定的羟脯氨酸乘以一定的系数就可以得到胶原蛋白的含量,测定羟脯氨酸的方法有多种,而这些方法既有测定复合型的 *L*-羟脯氨酸也有测定游离型的 *L*-羟脯氨酸,其中包括分光光度法^[2,3,4]、氨基酸分析法^[5,6]、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[7,8]和比色法^[9]等,其中以分光光度法最为常见,如测定动物组织^[10]、猪肉^[11]、胶原海绵^[12]和鱼皮^[13]中羟脯氨酸的含量。紫外分光光度法虽然简单,但会受基质的不同而影响,氨基酸分析法和液相法,检测的时间一般会比较长。为了能在短时间内检测 *L*-羟脯氨酸,本文探讨了高效液相色谱串联质谱法检测 *L*-羟脯氨酸的含量,同时通过酸水解对样品的处理,能把保健品里总的 *L*-羟脯氨酸一起检测出来,该方法简便、高效、准确。

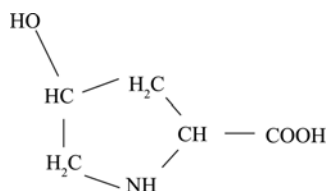


图1 4-羟脯氨酸的结构式
Fig.1 Structure of 4-hydroxyproline

2 材料与方法

2.1 仪器和试剂

L-羟脯氨酸标准品(来源: Sigma; 批号: MKBH

0984V, 纯度: 100%); 乙腈(色谱纯, CNW); 乙酸铵(色谱纯, CNW); 甲酸(色谱纯, CNW); 蒸馏水; 胶原蛋白口服液(汤臣倍健股份有限公司)。

超声波清洗器(EQ-500, 昆山市超声仪器有限公司); 高效液相色谱仪(美国安捷伦 1260); 色谱柱(EC-C18, 4.6 mm×50 mm, 2.7 μm, 美国安捷伦); 质谱(API3200, 美国 AB 公司)。

2.2 色谱条件

流动相: 水相(称取 0.771 g 乙酸铵加水 1.0 L 溶解, 用乙酸调 pH=3.5, 过滤, 即得。)和乙腈, 流动相梯度见表 1; 流速: 0.4 mL/min; 柱温: 40 °C; 时间: 9 min; 进样量: 5 μL。

表1 流动相梯度表
Table 1 Mobile phase gradient tables

时间(min)	0.01 mol/L 乙酸铵	乙腈
0.00	90	10
5.00	75	25
5.01	90	10
9.00	90	10

2.3 质谱条件

(1) 以电喷雾离子源(ESI)阳离子模式, 气帘气 20 psi; 碰撞气 6 psi; 喷雾电压 5500 V; 离子源温度 600 °C; 雾化气 50 psi; 辅助气 50 psi; 时间 9 min。

(2) *L*-羟脯氨酸质谱参数, 见表 2。

2.4 标准品溶液的配制

精确称取 *L*-羟脯氨酸标准品 5.68 mg 于 100 mL 棕色容量瓶中, 加 0.1% 的甲酸水溶液定容至刻度, 超声, 摇匀, 放在 4 °C 的冰箱中储存备用。分别精密移取 *L*-羟脯氨酸标准贮备液 5.0、10.0、15.0、20.0、50.0 mL 于 100 mL 棕色容量瓶中, 加 0.1% 的甲酸水溶液定容至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 进样量为 5 μL, 以浓度 C(mg/mL)为横坐标, 峰面积 (A)为纵坐标, 绘制标准工作曲线。

表 2 *L*-羟脯氨酸的质谱 MRM 监测条件

Table 2 Mass spectrometry MRM monitoring conditions of *L*-hydroxyproline

母离子	子离子	采集时间(ms)	锥孔电压(V)	入口电压(V)	碰撞能量(eV)	出口电压(V)
132.07	86.1	150	36	6	23	4
132.07	68.0	150	36	6	29	14

132.07 为母离子碎片, 86.1 为定量离子碎片, 68.0 为定性离子碎片。

2.5 供试品溶液的制备^[14]

精密称取适量样品, 置于 25 mL 磨口具塞比色管内, 加 6 mol/L 盐酸 15 mL, 加入 0.2 g 苯酚, 用旋转混合仪和超声仪使样品充分分散并溶解, 充氮气, 盖紧塞子, 置于 110 °C±1 °C 的恒温干燥箱内, 水解 22 h, 取出冷却, 过滤, 用蒸馏水冲洗比色管, 将水解液全部转移至 50 mL 容量瓶中, 用蒸馏水定容至刻度, 摇匀。精密吸取水解液 1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中, 置于真空干燥箱内, 于 40 °C~50 °C 减压干燥(真空干燥箱内放入五氧化二磷作为干燥剂), 干燥后残留物用 0.1% 的甲酸水溶液定容至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 即为供试品溶液, 取滤液进样 5 μL。

2.6 线性实验

将标准品贮备液分别稀释成: 0.00284、0.00568、0.00852、0.01136、0.0284 mg/mL 5 个浓度, 经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 每个浓度以 5 μL 注入色谱系统。

2.7 精密度实验

称取 6 份样品, 按 2.5 试样制备方法处理样品, 检测样品含量, 计算其 RSD(%)。

2.8 加标回收率实验

精密称取适量样品, 共 9 份, 置于 25 mL 磨口的具塞比色管内, 分成 3 组, 每组 3 份, 于每一组中分别加

羟脯氨酸标准品 2.18、3.22、3.76 mg, 加 6 mol/L 盐酸 15 mL, 加入 0.2 g 苯酚, 用旋转混合仪和超声仪使样品充分分散并溶解, 充氮气, 盖紧塞子, 置于 110 °C±1 °C 的恒温干燥箱内, 水解 22 h, 取出冷却, 过滤, 用蒸馏水冲洗比色管。将水解液全部转移至 50 mL 容量瓶中, 用蒸馏水定容至刻度, 摇匀, 精密吸取 1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中, 置于真空干燥箱内, 于 40 °C~50 °C 减压干燥(真空干燥箱内放入五氧化二磷作为干燥剂), 干燥后残留物用 0.1% 的甲酸水溶液定容至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 即为供试品溶液, 取滤液进样 5 μL。

2.9 稳定性试验

取 *L*-羟脯氨酸标准品液(浓度为 0.00852 mg/mL) 分别在室温下放置 0、2、4、8、12、24 h 后进样, 进样量为 5 μL, 计算其峰面积的相对标准偏差 RSD(%), 考察该方法的稳定性。

3 结果与讨论

3.1 色谱行为

采用液相质谱联用法能快速检测保健品中 *L*-羟脯氨酸, 不会因为其他因素而影响检测。采用水相和乙腈按一定的梯度进行洗脱, 9 min 就能把样品中 *L*-羟脯氨酸流出。通过 LC-MS/MS 在正离子模式下检测, 能达到准确的分离和定量, 见图 2 和图 3。

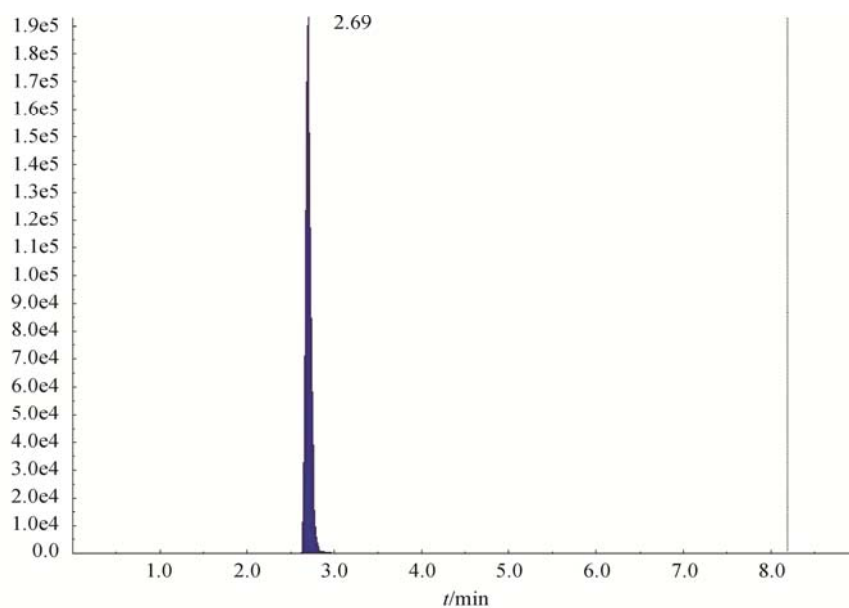


图 2 *L*-羟脯氨酸标准品的质谱峰图

Fig. 2 *L*-hydroxyproline standard of mass spectrum peak figure

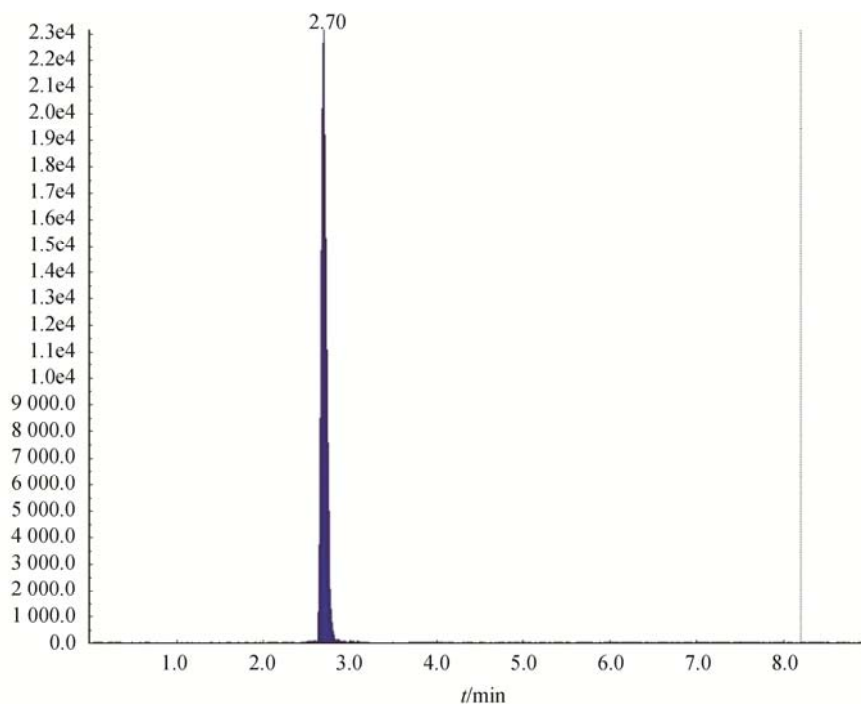


图3 样品的质谱峰图

Fig. 3 The mass spectrum peak figure of the sample

3.2 线性实验

线性实验结果如表3所示, 相关系数 R^2 为1.0000, 所以用该方法测定L-羟脯氨酸的含量, 在浓度为0.00284 mg/mL~0.0284 mg/mL之间呈现良好的线性。

表3 线性实验结果

Table 3 Linear experimental results

序号	浓度 C(mg/mL)	羟脯氨酸峰面积(A)
STD1	0.00284	277000
STD2	0.00568	539000
STD3	0.00852	802000
STD4	0.01136	1070000
STD5	0.0284	2680000
线性方程	$A=9.42e+007X+3880$	
相关系数(R^2)	1.0000	

3.3 检出限和定量限实验

分析方法的检出限 DL 和定量限 QL 由信噪比(S/N)计算。DL 定义为 $S/N=3$ 时对应的待分析物浓度, QL 定义为 $S/N=10$ 时对应的分析物浓度。

3.3.1 检出限

精密量取浓度为0.00284 mg/mL的羟脯氨酸工作标准溶液1.0 mL于100 mL棕色瓶中, 定容至刻度, 即得浓度为0.0284 $\mu\text{g/mL}$ 的标准品溶液, 再取该浓度的羟脯氨酸标准液3 mL于25 mL棕色容量瓶中, 定容至刻度, 摇匀, 即得浓度为: 0.003408 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 以 $S/N=3$ 定方法的检出限浓度, $DL = 0.003408 \mu\text{g/mL} \times 500 \text{ mL} / 1.2 \text{ g} = 1.42 \mu\text{g/g}$ 。

3.3.2 定量限

以 $S/N=10$ 定方法的检测浓度为: $QL = 0.003408 \mu\text{g/mL} / 3 \times 10 = 0.01136 \mu\text{g/g}$, 按实际样品的处理过程计算, 方法的定量限为: $1.42 \mu\text{g/g} \times 10 / 3 = 4.7 \mu\text{g/g}$ 。

3.4 精密度实验

从表4中可以看出, 6个胶原口服液的样品的含量范围为315.584 mg/100 mL~336.563 mg/100 mL, 平均含量是327 mg/100 mL, 相对标准偏差(RSD)为2.8%, 具有良好的精密度。

3.5 稳定性试验

L-羟脯氨酸标准溶液分别在室温下放置0、2、4、8、12、24 h, 其峰面积的RSD(%)为: 1.5%, 表明L-羟脯氨酸标准溶液在室温下24 h内的稳定性较好。

表 4 精密度的实验结果
Table 4 The precision of the experimental results

序号	称样量(g)	浓度(mg/mL)	含量(mg/100 mL)	平均含量(mg/100 mL)	RSD(%)
1	2.0013	0.012	315.584		
2	2.1302	0.0133	328.607		
3	2.0115	0.0127	332.299		
4	2.0218	0.0128	333.210	327.00	2.8
5	2.1424	0.0137	336.563		
6	2.0002	0.012	315.757		

表 5 加标回收率实验结果
Table 5 Standard addition recovery experiment results

序号	样品称样量(g)	样品含量(mg/100 mL)	测得对照品量(mg)	加标量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	1.9707	437.995	2.078020	2.18	95.322		
2	2.0429	437.973	2.153731	2.18	98.795		
3	2.0434	437.866	2.152178	2.18	98.723		
4	2.0617	487.589	3.145329	3.22	97.681		
5	2.0521	489.870	3.175151	3.22	98.607	96.86	1.7
6	2.0535	486.973	3.120802	3.22	96.919		
7	1.9836	517.400	3.587947	3.76	95.424		
8	1.9702	518.248	3.579574	3.76	95.201		
9	1.9721	517.748	3.573671	3.76	95.044		

3.6 加标回收率实验

从表 5 中可以看出, 在不同添加水平下, 保健品中 L-羟脯氨酸方法的回收率范围为 95.0%~98.8%, 平均回收率为 96.86%, 相对标准偏差(RSD)为 1.7%。

4 结 论

本文通过对样品进行酸水解的前处理, 采用 0.01 mol/L 乙酸铵和乙腈作为流动相, 按一定的梯度经安捷伦色谱柱(EC-C18, 4.6 mm×50 mm, 2.7 μm), 采用液相-串联质谱法, 能很快分离保健品中 L-羟脯氨酸, 并进行定量检测。通过测定其线性范围、检出限、定量限、精密度、稳定性和回收率实验, 结果令人满意。表明该方法适用于测定保健品中 L-羟脯氨酸的含量检测。

参考文献

- [1] 夏金根, 陈波, 姚守拙. 高效液相色谱-质谱联用测定胶原蛋白中的羟脯氨酸[J]. 色谱, 2008, 26(5): 595-598.

Xia JG, Chen B, Yao SC. Determination of hydroxyproline in collagen by high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2008, 26(5): 595-598.

- [2] 殷明文, 南宇梅, 王新民. 分光光度法测定羟脯氨酸的改进[J]. 河南医科大学学报, 1994, 29(1): 74-76.

Yin MW, Nan YM, Wang XM. Improvement of determination of hydroxyproline spectrophotometry spectrophotometric method [J]. J Henan Med Univ, 1994, 29(1): 74-76.

- [3] 王娣, 毛琰, 张会军. 分光光度法测定酸奶中 L-羟脯氨酸含量的不确定度评定[J]. 食品工业科技, 2013, 34(12): 76-80.

Wang D, Mao L, Zhang HJ. Uncertainty evaluation of L-hydroxyproline in yogurt by spectrophotometry [J]. Sci Technol Food Ind, 2013, 34(12): 76-80.

- [4] 戴绚丽, 范立英, 任艳. 对二甲氨基甲醛分光光度法测定奶粉中 L-羟脯氨酸含量[J]. 食品工业科技, 2009, 30(03): 313-314.

Dai XL, Fan LY, Ren Y. Determination of L-hydroxyproline in milk powder by P-dimethylaminobenzaldehyde spectrophotometry [J]. Sci Technol Food Ind, 2009, 30(03): 313-314.

- [5] 增暖茜, 王洪健, 周兴起, 等. 氨基酸自动分析仪对乳制品中羟脯氨酸的测定方法研究[J]. 现代食品科技, 2008, 24(07): 719-721.

- Zeng NX, Yang HJ, Zhou XQ, *et al.* Determination of hydroxyproline in dairy products by amino acid analyzer [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2008, 24(07): 719-721.
- [6] 张秀尧, 梁晓蓉, 蔡欣欣. 氨基酸自动分析仪检测乳及乳制品中羟脯氨酸[J]. *中国卫生检验杂志*, 2009, 10: 2305-2306.
- Zhang XR, Liang XR, Cai XX. Detection of hydroxyproline in dairy products using amino acid analyzer[J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2009, 10: 2305-2306.
- [7] 黄会, 宫向红, 刘慧慧, 等. 柱前衍生高效液相色谱法测定水产品中羟脯氨酸含量[J]. *食品科学*, 2012, 33(08): 207-210.
- Huang H, Gong XH, Liu HH, *et al.* Determination of hydroxyproline in fishery products by Pre-column derivatization-High performance liquid chromatography [J]. *Food Sci*, 2012, 33(08): 207-210.
- [8] 胡华, 吕定, 杜青, 等. 高效液相色谱法检测酱油中羟脯氨酸的含量[J]. *中国调味品*, 2010, 4: 106-109.
- Hu H, Lv D, Du Q, *et al.* Detection of hydroxyproline in soy sauce by high performance liquid chromatography [J]. *China Cond*, 2010, 4: 106-109.
- [9] 赵天珍, 袁秀金, 谭贵良, 等. 比色法快速测定奶粉和含乳饮料中游离 L-羟脯氨酸[J]. *食品研究与开发*, 2008, 12:111-113.
- Zhao TZ, Yuan XJ, Tan GL, *et al.* Determination of free L-hydroxyproline in milk powder and milk drink by colorimetry method [J]. *Food Res Devel*, 2008, 12:111-113.
- [10] 冯志民, 马旺扣. 动物组织中羟脯氨酸测定方法的建立及初步应用[J]. *南京铁道医学院学报*, 1999, 3: 168-170.
- Feng ZM, Ma WK. Preliminary application and assay of hydroxyproline in animal tissue[J]. *J Nanjing Rail Med Coll*, 1999, 3: 168-170.
- [11] 蓝蔚青, 王川, 李燕, 等. 猪皮中羟脯氨酸含量的测定[J]. *中国食品与营养*, 2006, 10: 38-40.
- Lan WQ, Wang S, Li Y, *et al.* Determination of the content of hydroxyproline in the pigskin [J]. *Food Nutr Chin*, 2006, 10: 38-40.
- [12] 关静, 叶萍. 胶原海绵的羟脯氨酸含量测定[J]. *氨基酸和生物资源*, 2000, 1: 52-54.
- Guan J, Ye P. Determination of hydroxyproline in collagen sponge[J]. *Amino Acid Bio Res*, 2000, 1: 52-54.
- [13] 郭恒斌, 曾庆祝. 分光光度法测定鱼皮中羟脯氨酸含量测定[J]. *食品研究与开发*, 2007, 10: 145-147.
- Guo HB, Zeng QZ. Spectrophotometric determination of hydroxyproline content in fish skins [J]. *Food Res Develop*, 2007, 10: 145-147.
- [14] GB/T 5009.124-2003 食品中氨基酸的测定[S].
- GB/T 5009.124-2003 Determination of amino acids in foods [S].

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



蔡伟江, 本科, 中药师, 主要研究方向为保健食品的质量检测。
E-mail: 714524253@qq.com