使用SCIEX 中国本土化Triple Quad™ 6500+系统对胶原蛋白进行定量分析

Quantitative Analysis of Collagen Using SCIEX Triple Quad™ 6500+ CHINA SYSTEM

高铁，吕小磊，陈泓序，刘冰洁

Gao Tie, Lv Xiaolei, Chen Hongxu, Guo Lihai, Liu Bingjie

SCIEX，中国

SCIEX, China

关键词： 三重四极杆质谱；胶原蛋白；定量分析；

1、前言

胶原蛋白（collagen）是一类哺乳动物细胞外基质中的主要结构蛋白，广泛地存在于皮肤、骨骼、肌肉等组织中，主要参与细胞的增殖、分化、迁移等生理生化行为。对组织细胞等起着支撑、修复、保护的作用。由于胶原蛋白具有良好的生物学特征，其在组织工程、临床医学、食品工业、包装材料、化妆品、医疗美容、生物材料以及医疗器械等方面都有广泛的应用。

胶原蛋白可以分为天然和重组两大类，无论是是什么类型胶原蛋白，都需要对其进行浓度或含量的测定。而蛋白定量有多种分析技术，如紫外、ELISA、三重四极杆质谱等等。紫外进行蛋白定量分析是基于蛋白中的芳香族氨基酸，比如酪氨酸、色氨酸，而胶原蛋白中氨基酸种类较少，主要是由甘氨酸、脯氨酸等非芳香族氨基酸组成，紫外检测吸光度不够，会导致灵敏度和批次差异性较差；ELISA进行蛋白定量分析是基于抗体抗原结合，而普通免疫方法的抗体无法区分胶原蛋白、或存在交叉反应，导致干扰性强结果不准确。

面对不同类型的胶原蛋白产品，其含量或添加量可能天差地别，比如口服饮品/粉剂，其胶原蛋白官方宣称含量在2~10 g/份，注射填充剂其胶原蛋白官方宣称含量在10~30 mg/mL，护肤精华/面膜等类型产品其胶原蛋白官方宣称含量在0.1%~5%（w/w）左右（约为1-50 mg/mL）。

利用三重四极杆质谱进行胶原蛋白定量是一种高灵敏度及特异性的定量方法，选择合适的特征肽段，并合成标准品，筛选其子离子与母离子作为定量离子对。通过梯度浓度的标准品制作外标曲线，样品经过特定酶切处理后即可进行其浓度/含量测定。胶原蛋白的定量可参考公式1。

$$\text{公式 1} \cdots\cdots\cdots\cdots X_i = \frac{C_i \times X \times V \times M_1}{m \times M_2 \times n \times 1000}$$

公式中，X_i表示试样中胶原蛋白含量（质量比），如要测定质量浓度，去掉公式中的V和m。C_i表示质谱法测得的胶原特征多肽浓度；V表示样品最终定容体积；M_1表示胶原蛋白分子量；M_2表示胶原蛋白特征多肽的分子量；m表示最终样液代表的试样质量；X表示酶解后样品稀释倍数；n表示胶原蛋白换算系数（如果三条链相同的胶原蛋白，n为3；如果三条链不同，n为1；如果两条链相同且特征多肽选自这两条肽段，n为2；如果胶原蛋白为重组，通常为单链，n为1）。

本应用通讯使用SCIEX中国本土化Triple Quad™ 6500+系统对重组类型的胶原蛋白进行了含量测定，提供了高灵敏度及特异性的定量分析方法。实验流程主要分为以下步骤：

1) 根据胰蛋白酶酶切后的肽段进行母离子的选择，在仪器中筛选合适的子离子；

2) 优化源气参数（主要为Gas1、Gas2、Temperature、DP、CE等）；

表1. 特征肽段的梯度稀释浓度

梯度	1	2	3	4	5	6	7	8
浓度(μg/mL)	0.05	0.1	0.2	0.5	1	2	5	10

3) 梯度浓度的特征多肽进行外标曲线的制作；

4) 根据曲线测定样品中的特征多肽浓度，最后根据公式1测定胶原蛋白含量。

2、实验方法

2.1 样品及其前处理

护肤精华类型重组胶原蛋白样品（液体）由国内某企业提供，该重组胶原蛋白为单链；

样品前处理步骤：使用移液枪移取100 μL胶原蛋白，使用900 μL 50 mM碳酸氢铵（pH 7.5）充分混合均匀，100℃加热30 min；变性后加入胰蛋白酶10 μg，充分震荡混匀，封口膜封好后于37℃水浴反应过夜；再将酶切后的样品置于100℃水浴中反应5 min，取出冷却至室温，使用去离子水稀释30倍后进样。

特征肽段序列为GRP********R，由国内第三方公司合成，浓度为10 mg/mL，使用0.1% BSA逐级稀释为表1浓度。

2.2 色谱方法

使用SCIEX ExionLC™ AD系统，色谱柱为ACQUITY Peptide BEH C18，130Å, 1.7 μm，100 × 2.1 mm。柱温箱温度为60℃，样品温控为10℃。流动相A为0.1%甲酸水溶液，流动相B为0.1%甲酸乙腈，其流速与梯度如表2。

表2. 液相梯度

Time[min]	Flow[mL/min]	A.Conc[%]	B.Conc[%]
0	0.3	90	10
0.5	0.3	90	10
4.0	0.3	2	98
7.0	0.3	2	98
7.1	0.3	90	10
10	0.3	90	10

2.3 质谱方法

使用SCIEX中国本土化Triple Quad™ 6500+系统，数据采集方法为多反应检测（MRM），源气参数设置为正离子模式，喷雾气Gas1：50 psi，辅助加热气Gas2：50 psi，气帘气Curtain Gas：35 psi，碰撞气CAD Gas：9 psi，离子源温度TEM：500℃，离子源电压IS：5500 V。MRM离子对信息见表3。

表3. MRM离子对信息

离子对	母离子 (Q1)	子离子 (Q2)	驻留时间 (Dwell time, ms)	去簇电压 (DP)	碰撞能量 (CE)
1	540.4	866.5	245	160	32
2	540.4	599.5	245	160	37

3. 实验结果

3.1 定量灵敏度和线性

使用SCIEX 中国本土化Triple Quad™ 6500+系统匹配OS软件进行数据采集及定量分析。空白样品中无干扰，有很好的专属性和灵敏度。我们采用的特征肽段浓度为0.05~10 μg/mL（图2），而在0.05 μg/mL浓度下信噪比是490，远高于定量的信噪比为10的要求。在该浓度范围内线性良好，$R^2 > 0.99$，准确度均在85%~115%之间（图3）。

3.2样品结果分析

将处理好的样品上机检测，连续重复三针，三针重复的RSD为4.03%，根据峰面积自动计算得到特征肽段的浓度平均值为0.001 mg/mL，结果如图3。根据公式1测定该产品中的胶原蛋白浓度为1.40 mg/mL，质量比为0.14%。

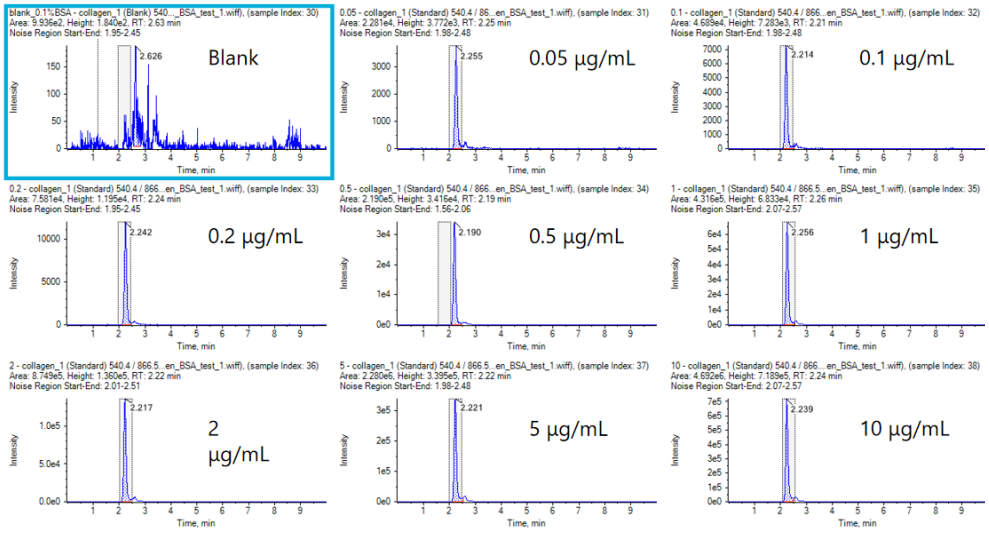


图1. 胶原蛋白特征肽段各个浓度点的提取离子流色谱图

Index	Sample Name	Sample Type	Component Name	Component Type	Actual Concentration	Expected RT	Area	Used	Calculated Concentration	Accuracy
1	blank_0.1%BSA	Blank	collagen_1	Quantifiers	N/A	2.21	9.936e2	☑	8.000e-4	N/A
3	0.05	Standard	collagen_1	Quantifiers	0.05	2.26	2.281e4	☑	5.049e-2	100.99
5	0.1	Standard	collagen_1	Quantifiers	0.10	2.21	4.689e4	☑	1.054e-1	105.36
7	0.2	Standard	collagen_1	Quantifiers	0.20	2.24	7.581e4	☑	1.713e-1	85.63
9	0.5	Standard	collagen_1	Quantifiers	0.50	2.21	2.190e5	☑	4.976e-1	99.51
11	1	Standard	collagen_1	Quantifiers	1.00	2.21	4.316e5	☑	9.817e-1	98.17
13	2	Standard	collagen_1	Quantifiers	2.00	2.21	8.749e5	☑	1.992e0	99.59
15	5	Standard	collagen_1	Quantifiers	5.00	2.21	2.280e6	☑	5.194e0	103.87
17	10	Standard	collagen_1	Quantifiers	10.00	2.21	4.692e6	☑	1.069e1	106.87

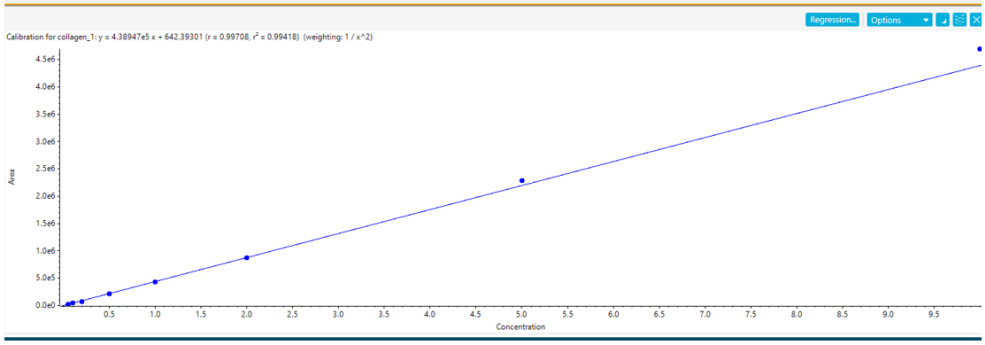
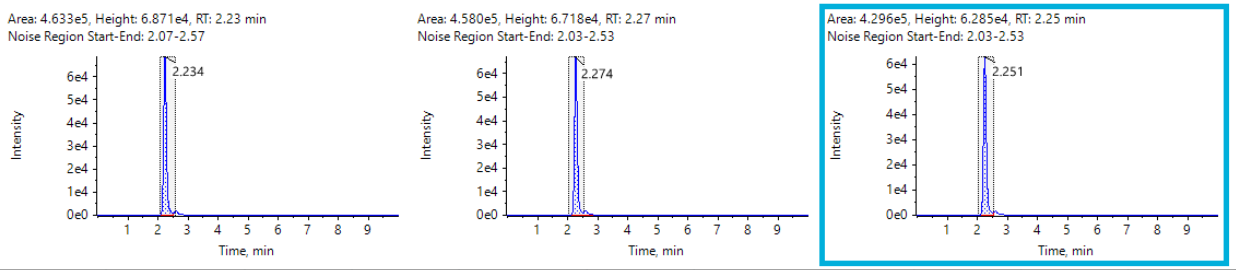


图2. 胶原蛋白特征肽段梯度浓度0.05~10 µg/mL的线性及准确度考察



Component Name	Actual Concentration	Num. Values	Mean	Standard Deviation	Percent CV	Average Accuracy across Replicates	Value #1	Value #2	Value #3
collagen_1	0.00	3 of 3	1.024e0	4.129e-2	4.03	N/A	1.054e0	1.042e0	9.772e-1

图3. 胶原蛋白样品的重复性考察

4、结论

本实验通过SCIEX 中国本土化Triple Quad™ 6500+系统对重组胶原蛋白产品进行MRM定量。灵敏度高，特异性好，空白样品中无干扰，在0.05~10 μg/mL的范围内线性关系良好，并且具有很好的准确度和重现性，RSD<5%。整个流程操作快速简单，可以为胶原蛋白定量提供参考。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅https://sciex.com.cn/diagnostics。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2025 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. MKT-35588-A

The power of precision

SCIEX中国

北京分公司
北京市昌平区生命科学园科学园路
18号院A座一层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7201
传真：021-2419-7333

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话：020-8842-4017

全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

官网：sciex.com.cn

官方微信：SCIEX-China