

LCMS-8060 测定食源性低聚肽中的肌肽及鹅肌肽

LCMSMS-349

摘要： 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 Nexera X2 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用测定食源性低聚肽中的肌肽及鹅肌肽的方法。低聚肽原料经水复溶，采用 Inertsil Amide HP(2.1 mm I.D. × 100 mm L., 3 μm) 色谱柱实现分离，外标法定量。肌肽及鹅肌肽的线性相关系数均高于 0.998，线性范围为 0.98 ng/mL ~ 250 ng/mL。以低浓度低聚肽原料为基质，添加 1 ng/mL、10 ng/mL、100 ng/mL 三个浓度的质控，回收率在 92.5 ~ 105.6% 之间。该方法简便、快速，适用于食源性低聚肽成品准确定值。

关键词： 超高效液相色谱 三重四极杆质谱 肌肽 鹅肌肽

肌肽（丙氨酰组氨酸，Carnosine）是一种水溶性天然的二肽，由 β- 丙氨酸和 L- 组氨酸通过肌肽合成酶合成，1900 年在俄国首次发现，随后它的甲基化衍生物鹅肌肽（Anserine）在 1929 年分离得到，由 β- 丙氨酸和 L- 甲基组氨酸组成。这类二肽广泛存在于机体的各器官组织，是继 SOD 和 VE 后又一被发现天然非酶促自由基清除剂和抗氧化剂。肌肽与鹅肌肽被广泛用于食品工业、化妆品、医学等领域。可利用牛

肉、猪肉、鸡肉和鱼肉等原料进行水解，制备富含肌肽、鹅肌肽的低聚肽产品。

目前，文献报道主要使用柱前衍生 - 高效液相色谱法、液相色谱 - 串联质谱法检测食源性基质中的组氨酸二肽。本文使用岛津三重四极杆液质联用系统 LCMS-8060 对两种组氨酸二肽进行了分析，建立了食源性低聚肽中肌肽及鹅肌肽的定量检测方法，为低聚肽生产工艺优化及质量控制提供手段。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津超高效液相色谱仪 Nexera X2 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD × 2 输液泵，DGU-20A_{SR} 在线脱气机，SIL-30ACMP 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.89 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Inertsil Amide HP(2.1 mm I.D. × 100 mm L., 3 μm)

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水溶液

B 相 -0.1% 甲酸（乙腈）

流速：0.4 mL/min

柱温：40°C

进样量：0.5 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 70%，洗脱程序见表 1。

洗针模式：R3 → R0，其中 R3 为 0.5% FA 乙腈 / 水（2：8），R0 为乙腈 / 水（2：8）

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Action	Value
3	Pumps	Pump B Conc.	55
4	Pumps	Pump B Conc.	55
4.2	Pumps	Pump B Conc.	70
6	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式：ESI, 正离子模式

离子喷雾电压：+4.5 kV

雾化气流速：氮气 3.0 L/min

加热气流速：氮气 10 L/min

干燥气流速：氮气 10 L/min

DL 温度：250°C

MRM 参数：见表 2

加热模块温度：400°C

离子源温度：300°C

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：100 ms

延迟时间：3 ms

表 2 MRM 优化参数

序号	化合物	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
1	肌肽 (Car)	227.20	110.20*(a1)	-16.0	-22.0	-21.0
			156.10 (y1)	-14.0	-15.0	-11.0
2	鹅肌肽 (Ans)	241.20	109.10*	-10.0	-24.0	-12.0
			170.10 (y1)	-15.0	-17.0	-27.0

注：* 表示定量离子

1.3 多肽标准品配制方法

分别准确称取肌肽及鹅肌肽标准品粉末 2.0 mg，置于 10 mL 量瓶中，加水溶解，涡旋使样品完全溶解。分别取上述 200 µg/mL 标准品溶液 500 µL，置于 10 mL 量瓶中，加水定容即得混合标准溶液母液 10 µg/mL。将上述混合标准溶液母液用纯水逐级稀释至 0.98、1.95、3.91、7.81、15.63、31.25、62.5、125 和 250 ng/mL 的系列标准工作溶液。

1.4 样品前处理方法

取 2.0 mg 鸡肉水洗液冻干粉，置于 1.5 mL 离心管中，加入 1000 µL 水复溶，轻轻混匀，13000 rpm 离心 5 min，取上清液，以纯水稀释 104 倍，待测。

■ 结果与讨论

2.1 肌肽及鹅肌肽标准品质谱图

取肌肽及鹅肌肽混合标准品 1 µg/mL 直接进样，获得一级质谱图及碎片离子流图如下。

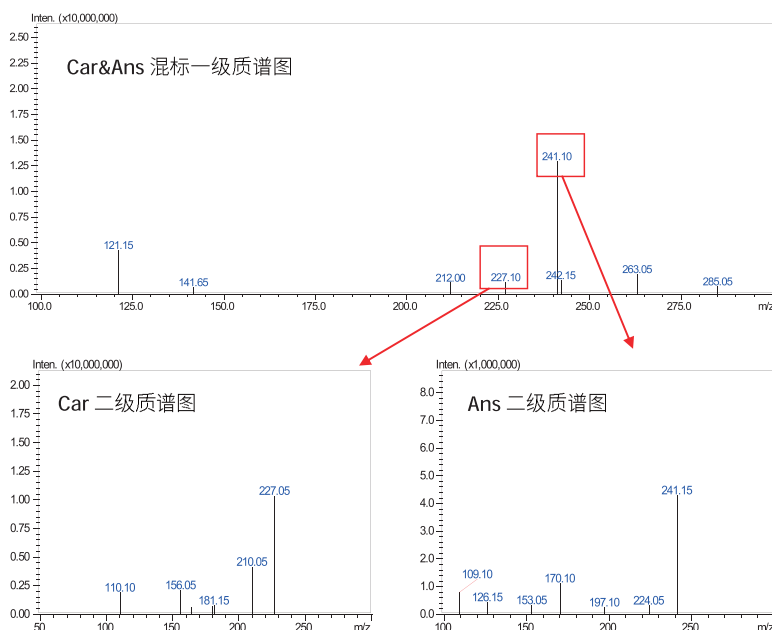


图 1 Car&Ans 混标一级、二级质谱图

2.2 多肽标准溶液的 MRM 色谱图

下图为空白溶剂、Car 和 Ans 混标的定量离子流图。

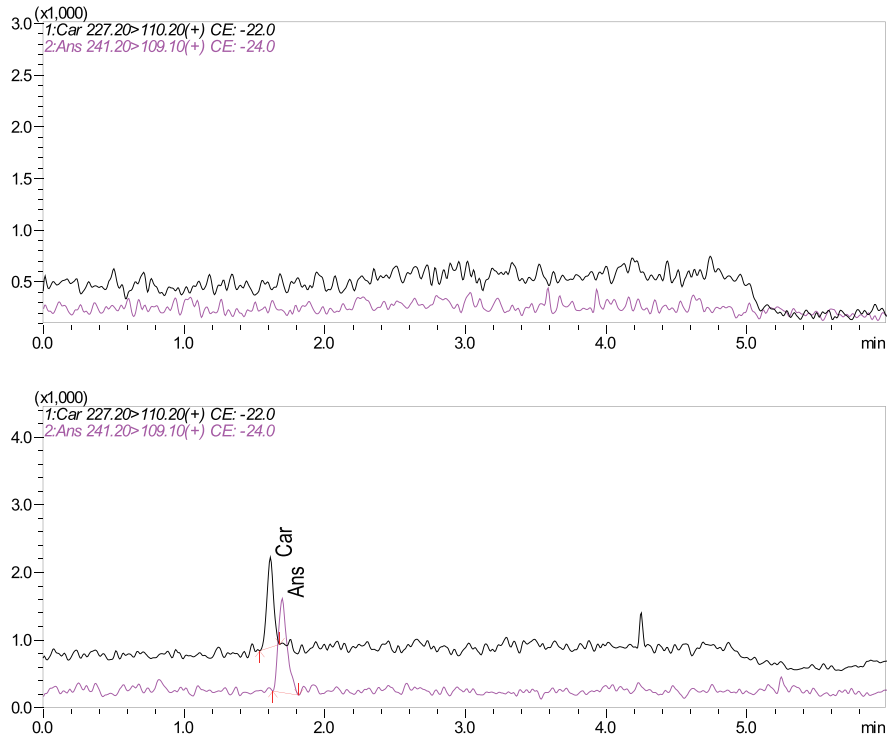


图 2 空白溶剂及标准溶液（浓度 1.95 ng/mL）中肌肽及鹅肌肽的定量离子流色谱图

2.3 系统残留测试

在高浓度样品（250 ng/mL）分析后，进空白溶剂，考察肌肽及鹅肌肽的残留情况，结果如图 3 所示。结果表明，高浓度样品分析后，系统无残留现象。

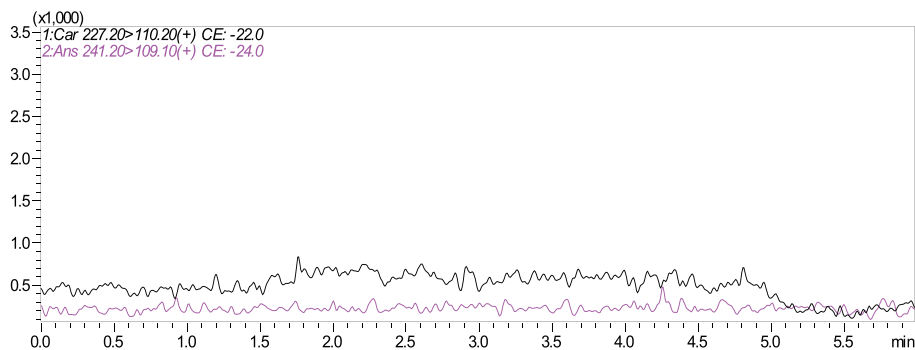


图 3 残留考察

2.4 线性范围

将上述混合标准溶液母液用纯水逐级稀释至 0.98、1.95、3.91、7.81、15.63、31.25、62.5、125 和 250 ng/mL 的工作溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定，外标法定量。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线，如图 4 所示，线性方程、线性范围和相关系数结果见表 3。

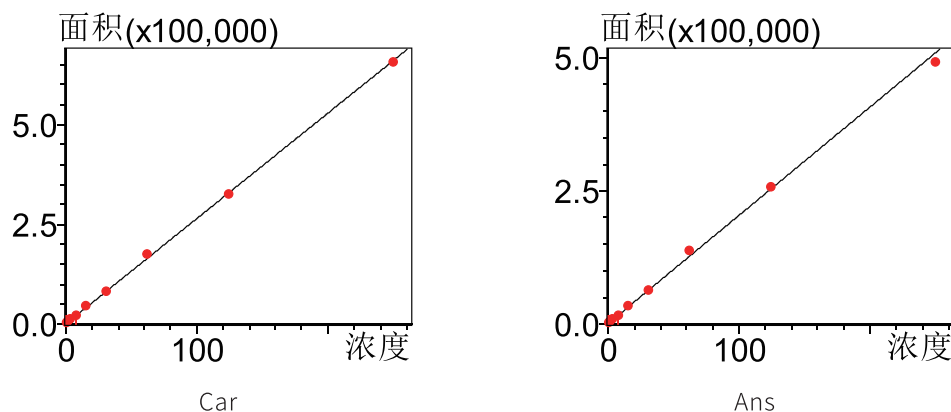


图4 肌肽及鹅肌肽的校准曲线

表3 校准曲线参数

编号	名称	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	相关系数 R	准确度 (%)
1	Car	$Y = (2638.81)X + (-746.969)$	0.98-250	0.9985	93.3-106.7
2	Ans	$Y = (2011.59)X + (1052.39)$	0.98-250	0.9988	92.5-104.9

2.5 灵敏度实验

对浓度为 1.95 ng/mL 混合标准溶液进样分析，计算肌肽及鹅肌肽的检出限 (S/N=3, LOD 表示)、定量限 (S/N=10, LOQ 表示) 结果如表 4 所示。

表4 检出限和定量限

编号	名称	检出限 (ng/mL)	定量限 ((ng/mL)
1	Car	1.050	3.183
2	Ans	0.694	2.104

2.6 回收率考察

由于无法获得空白样品，本实验采用标准加入法进行加标回收率考察。根据预实验的结果，选择肌肽及鹅肌肽含量相对较低的样品作为基质。取 10 μ L 不同浓度的混合标准品母液，加入 990 μ L 低浓度基质，配制成 1 ng/mL、10 ng/mL、100 ng/mL 加标浓度，每个浓度 6 份重复。根据校准曲线测定结果，计算肌肽及鹅肌肽加标回收率，结果如表 5 所示。

表5 加标回收率 (n=6)

编号	名称	本底	加标浓度 (ng/mL)	保留时间 RSD(%)	回收率 (%)
1	Car	1.10	1	0.338	105.6 \pm 9.9
			10	0.193	99.3 \pm 4.9
			100	0.333	98.5 \pm 7.9
2	Ans	1.49	1	0.260	90.4 \pm 11.0
			10	0.163	94.8 \pm 5.1
			100	0.297	92.5 \pm 7.7

2.7 实际样品分析

取 4 份鸡肉水洗液冻干粉，记录称样质量，精确到 1.0 mg。按照 1.4 条件进行样品前处理，稀释合适的倍数，上机分析，结果如下图 5 和表 6。

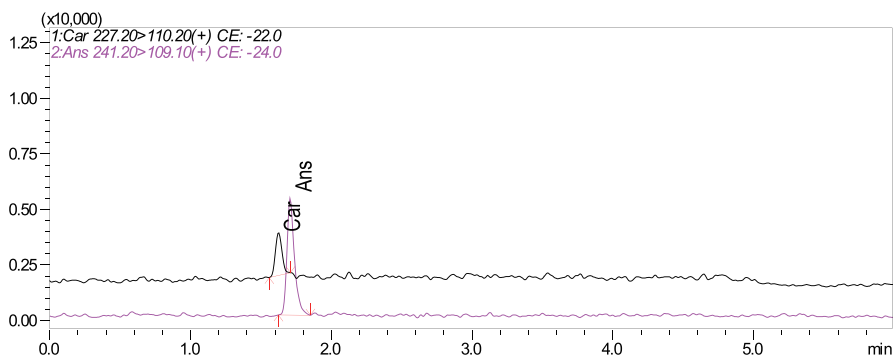


图 5 某样品肌肽及鹅肌肽 MRM 色谱图

表 6 某样品中肌肽及鹅肌肽的检测结果

样品编号	稀释倍数 ×	肌肽 (%)	鹅肌肽 (%)
R5	20000	2.56	8.00
R7	20000	5.01	11.79
R11	5000	4.93	11.31
R12	5000	4.04	8.21

■ 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 Nexera X2 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用测定食源性低聚肽中的肌肽及鹅肌肽的方法。结果显示，在 0.98 ng/mL ~ 250 ng/mL 范围内，肌肽及鹅肌肽线性相关系数均高于 0.998，低、中、高三个浓度的回收率在 92.5 ~ 105.6% 之间。该方法适用于肌肽及鹅肌肽的定量测定。

岛津应用云

