

使用氨基酸分析仪测定胶原蛋白中羟脯氨酸的含量

LC-464

摘要：本文参考 YY/T 1453-2016《组织工程医疗器械产品I型胶原蛋白表征方法》的相关条件和要求，采用岛津氨基酸分析仪 LC-16AAA 建立了一种自动柱后衍生高效液相色谱法测定胶原蛋白中羟脯氨酸含量的分析方法。实验结果表明：羟脯氨酸在 5~100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内，线性相关系数大于 0.999，准确度在 98.9~101.2% 之间。精密密度实验中，10 $\mu\text{g/mL}$ 标准溶液保留时间 RSD% 值为 0.15%，峰面积 RSD% 值为 0.77%。该方法中茚三酮柱后衍生和样品测定为全自动完成，线性佳，分离效果好，可为胶原蛋白中羟脯氨酸的测定提供参考。

关键词：胶原蛋白 柱后衍生 羟脯氨酸 钠型

技术特点：

- ❖ LC-16AAA 氨基酸分析仪结合配套试剂包可以实现胶原蛋白水解液中羟脯氨酸的全自动柱后衍生，方便快捷，减少人为误差；
- ❖ 相较于柱前衍生方法，LC-16AAA 柱后衍生法基质干扰小。

胶原蛋白是机体中含量最丰富的结构蛋白，广泛存在于结缔组织中，具有维持组织形态、增强韧性和促进修复的功能。近年来，随着医学和功能性食品等领域的快速发展，胶原蛋白在抗衰老、组织修复等方面的应用不断增长，为满足市场对高质量胶原蛋白的需求，除传统天然提取工艺外，合成生物学技术正逐步成为胶原蛋白生产的新途径。通过工程化微生物或细胞工厂合成胶原蛋白，该技术不仅能够实现来源可控、污染风险低等优势，还具备规模化 and 高效生产的能力，成为胶原蛋白制备的创新解决方案。

羟脯氨酸 (Hydroxyproline) 是胶原蛋白中特有的氨基酸，其含量是评价胶原蛋白纯度、来源和工

艺稳定性的重要指标。羟脯氨酸的定量检测为胶原蛋白在医用材料和食品保健领域的质量控制提供了科学依据，同时满足行业法规要求。通过精准测定羟脯氨酸含量，可验证产品质量、监控生产工艺，并为优化研发流程提供技术支持，对提升胶原蛋白产品的市场竞争力具有重要意义。

本实验依据 YY/T 1453-2016《组织工程医疗器械产品I型胶原蛋白表征方法》标准，采用高效液相色谱法 (HPLC) 对胶原蛋白水解液中羟脯氨酸进行定量分析。优化后的方法具有分离效果好、灵敏度高、重复性佳的特点，为胶原蛋白制品的研发与质量控制提供了可靠的技术手段。

实验部分

1.1 仪器

岛津氨基酸分析仪 LC-16AAA，配置信息如下：

系统控制器：CBM-20A
输液泵：LC-16 \times 3
柱温箱：CTO-16L
鼓泡单元：DGU-10B
检测器：SPD-16

脱气机：DGU-20A_{5R}
自动进样器：SIL-16
高温反应箱：CRB-40
切换阀：FCV-11AL
色谱工作站：Labsolutions Ver. 5.118

1.2 分析条件

色谱条件完全参照中国药典，具体如下：

色 谱 柱： Shim-pack Amino-Na (100×6.0 mm I.D., 5 μ m) (SGLC, P/N: S228-18837-91)
 捕 氨 柱： Shim-pack ISC-30 /S0504 Na (50×4.0 mm I.D.) (SGLC, P/N: S228-14206-91)
 流 动 相： 钠型氨基酸流动相试剂包流动相 A,B,C
 衍 生 试 剂： 茚三酮溶液
 流 速： 0.6 mL/min 衍生液流速： 0.2 mL/min
 柱 温： 60 $^{\circ}$ C 衍生反应温度： 130 $^{\circ}$ C
 进 样 体 积： 20 μ L 检 测 波 长： 440 nm
 洗 脱 方 式： 梯度洗脱，B 相初始浓度 0%，洗脱程序见表 1

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
9.00	泵	B.Conc	0
13.00	泵	B.Conc	7
17.20	泵	B.Conc	8
17.21	泵	B.Conc	11
20.80	泵	B.Conc	11
20.81	泵	B.Conc	50
22.00	泵	B.Conc	58
22.01	泵	B.Conc	100
28.80	泵	SV(Pump A)	B
29.30	泵	B.Conc	100
29.31	泵	B.Conc	0
33.00	泵	SV(Pump A)	A
35.00	泵	Total Flow	0.6
36.50	泵	Total Flow	0.7
43.30	泵	Total Flow	0.7
44.00	泵	Total Flow	0.6
48.00	控制器	Stop	

注：SV(PumpA) 表示 A 泵溶剂切换阀，“值”中选择 A 和 B 代表不同的流动相。

1.3 标准品溶液与试样的制备

羟脯氨酸标准储备液：准确称取羟脯氨酸标准品 1 mg，用流动相 A 溶解并定容至 1 mL，配制浓度为 1000 μ g/mL 标准储备液。

羟脯氨酸标准溶液：取适量羟脯氨酸标准储备液，用流动相 A 逐级稀释为 5、10、20、50 和 100 μ g/mL 的系列标准溶液。

样品制备：精密称定 SL403 样品 1 mg，至水解管中，加入 6 mol/L 盐酸溶液（含 1.0% 苯酚）1 mL，密封，于 105 $^{\circ}$ C 条件下水解 24 小时，氮气挥干；随后在样品水解管中加入 2 mL 流动相 A 溶解样品，振荡混匀后，吸取溶液通过 0.22 μ m 水系过滤器后，转移至仪器进样瓶中，供测定用。

■ 结果与讨论

2.1 标准品色谱图

标准品溶液图谱见图 1，结果显示，羟脯氨酸峰形正常，未出现干扰峰，说明在本实验条件下专属性良好。

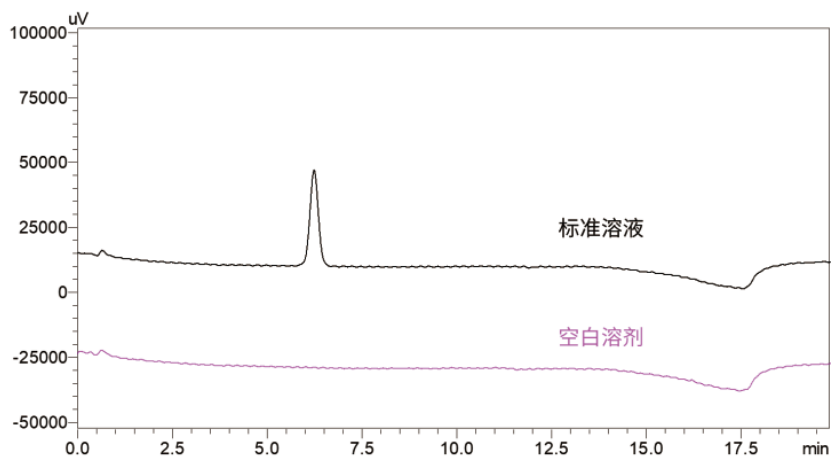


图 1 羟脯氨酸标准溶液 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和空白溶剂图谱

2.2 线性

取系列浓度标准品溶液进样，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，采用外标法建立线性校准曲线，校准曲线如图 2 所示。结果显示，羟脯氨酸在 5~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内，线性相关系数大于 0.999，准确度在 98.9~101.2% 之间。

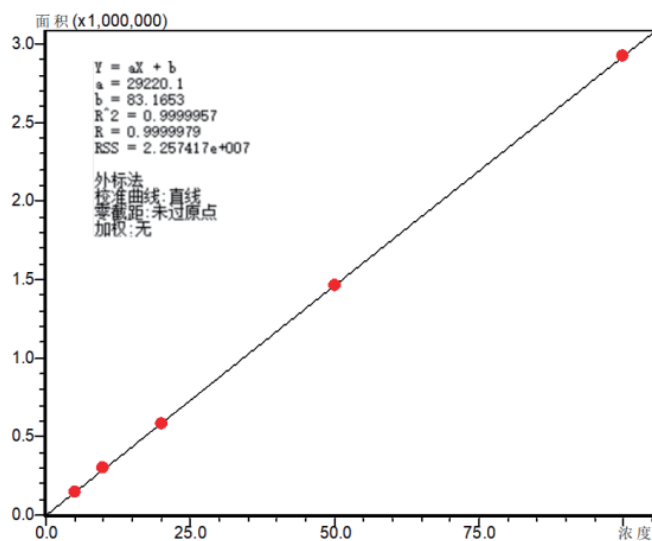


图 2 羟脯氨酸校准曲线

2.3 精密度分析

对 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准溶液连续进样 6 次，考察仪器的精密度，重叠色谱图如图 3 所示；其中保留时间 RSD 值为 0.15%，峰面积 RSD 值为 0.77%，仪器精密度良好。

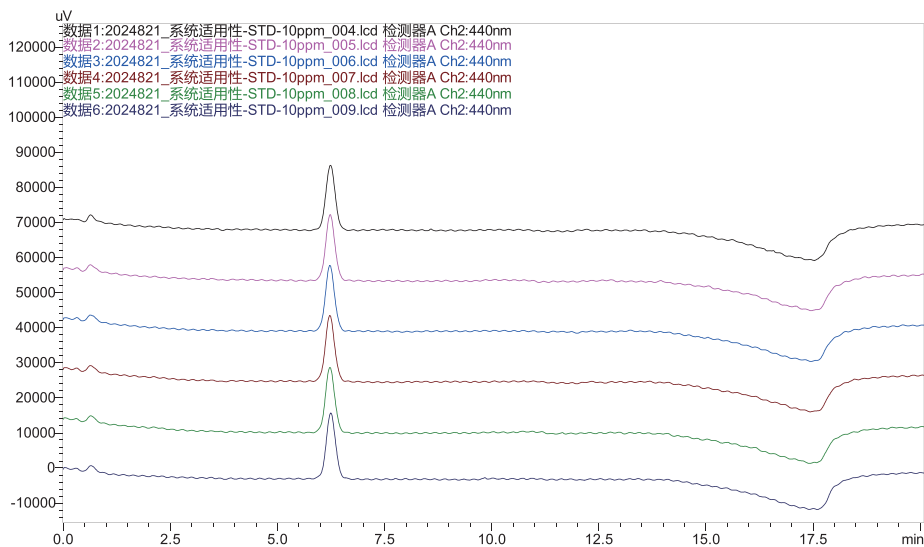


图3 标准溶液重叠色谱图 (n=6)

2.4 样品分析结果及回收率考察

取样品 SL403 按 1.3 节处理, 进样分析; 向该样品中添加 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的羟脯氨酸标准溶液, 进行回收率实验, 结果如图 4 和表 2 所示。

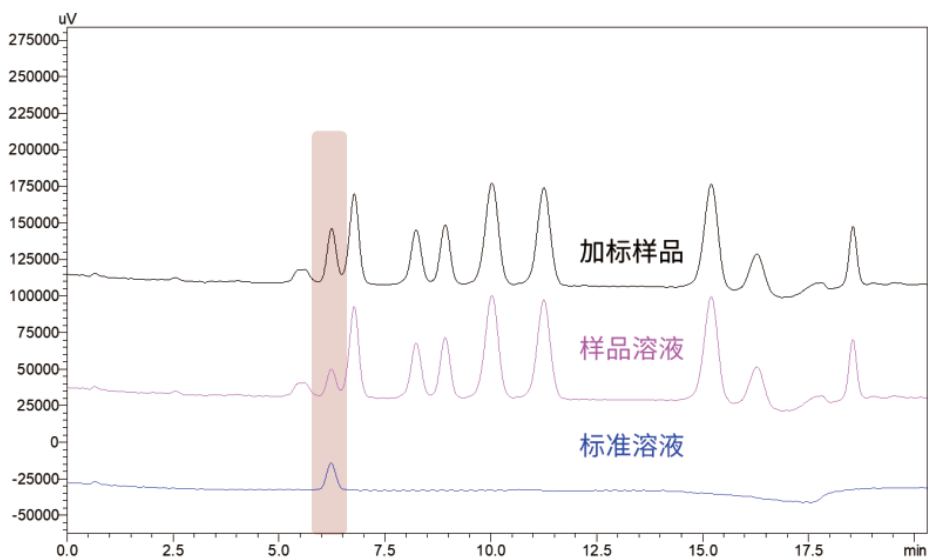


图4 羟脯氨酸标准溶液 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、SL403 样品及其加标后色谱图

表2 回收率测定结果

化合物	样品本底含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	加标浓度水平 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	加标结果 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	加标结果 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
羟脯氨酸	10.511	10.000	20.081	95.70

■ 结论

本文采用岛津氨基酸分析仪 LC-16AAA 建立了一种全自动柱后衍生高效液相色谱法测定胶原蛋白中羟脯氨酸含量的分析方法。结果显示线性、精密度结果均满足相关测定要求。该方法茚三酮柱后衍生和样品测定为全自动完成，分离效果好、重复性佳、结果准确可靠，适用于胶原蛋白样品中羟脯氨酸的含量测定分析。

岛津应用云

